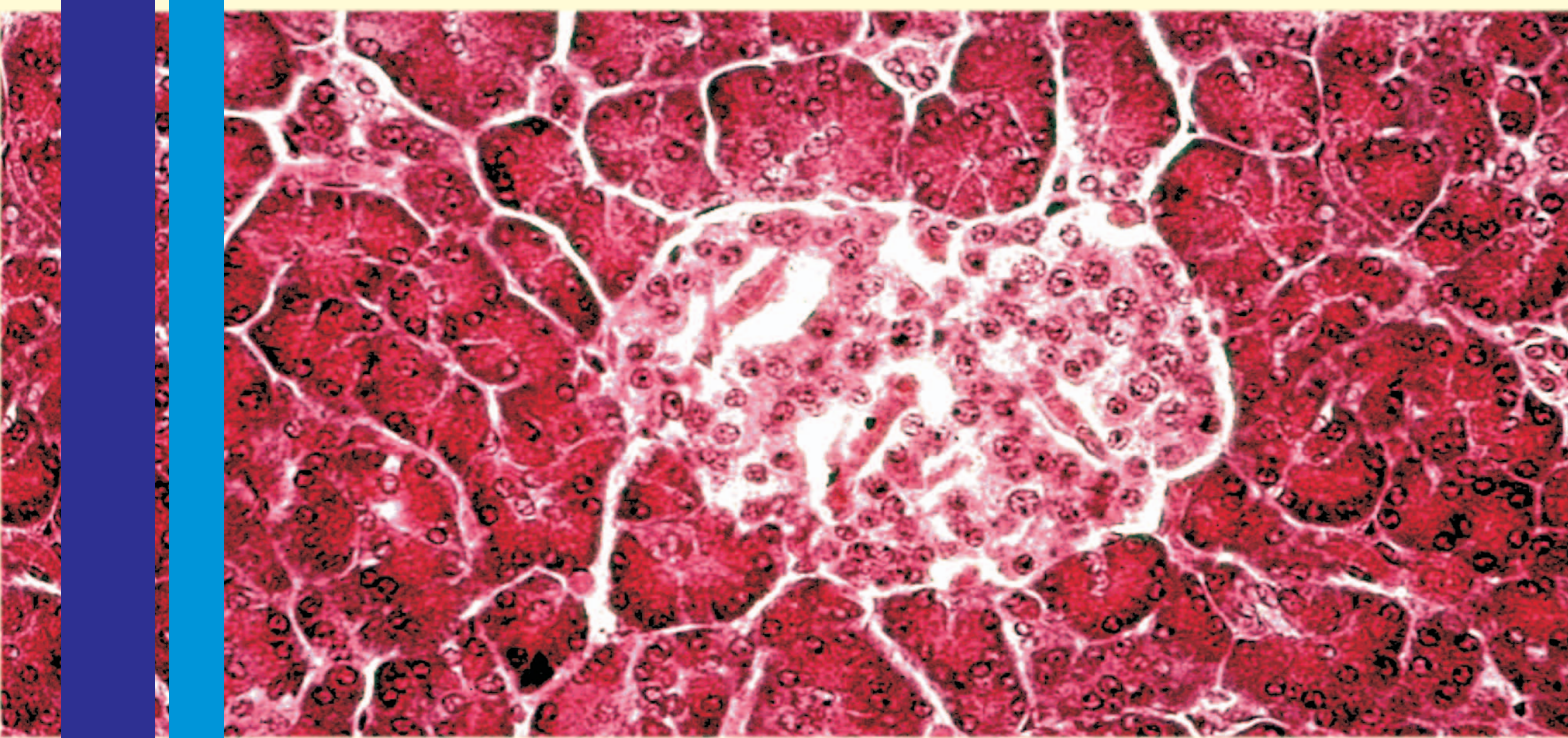


**ANTIINFLAMMATORISCHE STRATEGIEN ZUR  
OPTIMIERUNG DES FRÜHEN ÜBERLEBENS  
ISOLIERTER SCHWEINEINSELN NACH TRANSPLANTATION  
IN EUTHYMISCHE UND ATHYMISCHE LEWIS-RATTEN**

**FARIBORZ NAHIDI**



**INAUGURAL-DISSERTATION  
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES  
BEIM FACHBEREICH AGRARWISSENSCHAFT,  
ÖKOTROPHOLOGIE UND UMWELTMANAGEMENT  
DER JUSTUS-LIEBIG-UNIVERSITÄT GIESSEN**

**édition scientifique  
VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2005

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2005

© 2005 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG  
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757  
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

**Antiinflammatorische Strategien zur  
Optimierung des frühen Überlebens  
isolierter Schweineinseln nach Transplantation  
in euthymische und athymische Lewis-Ratten**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Agrarwissenschaft, Ökotoxikologie und  
Umweltmanagement der Justus-Liebig-Universität Giessen

Eingereicht von

**Fariborz Nahidi**

aus Sanandaj (Iran)

Giessen 2005

Aus der Medizinischen Klinik III und Poliklinik  
des Medizinischen Zentrums für Innere Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Prüfungsvorsitzende: Prof. Dr. med. K. Becker-Brandenburg

1. Gutachter: Prof. Dr. med. R.G. Bretzel

2. Gutachter: Prof. Dr. I. Bitsch

3. Prof. Dr. med. M. Krawinkel

4. Prof. Dr. C. Leitzmann

Dekan: Prof. Dr. W. Köhler

Tag der Disputation: 06. September 2005

Freunde, die ihre Sorgen und Leiden miteinander teilen, verbindet eine so tiefe und aufrichtige Zuneigung, wie sie bei einem gemeinsamen Erlebnis des Glücks nicht zustande kommt. Wer aus Liebe und Überzeugung dem Freund sein Leben opfert, empfindet eine Zuneigung für ihn, die der Freund in dieser Erhabenheit nicht spüren kann.

**Meinen Freunden, Frank, Shahram und Ajad**



**INHALTSVERZEICHNIS**

	Seite
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIALIEN UND METHODEN</b>	<b>7</b>
<b>2.1 Materialien</b>	<b>7</b>
<b>2.1.1 Reagenzien</b>	<b>7</b>
<b>2.1.2 Kit-Systeme</b>	<b>7</b>
<b>2.1.3 Antikörper</b>	<b>8</b>
<b>2.1.4 Medikamente</b>	<b>8</b>
<b>2.1.5 Narkotika</b>	<b>8</b>
<b>2.1.6 Zusammensetzung häufig benutzter Lösungen und Puffer</b>	<b>8</b>
<b>2.2 Methoden</b>	<b>11</b>
<b>2.2.1 Gewinnung und Isolierung der Schweineinseln</b>	<b>11</b>
<b>2.2.2 Haltung der Versuchstiere</b>	<b>11</b>
<b>2.2.3 Diabetesinduktion</b>	<b>12</b>
<b>2.2.4 Transplantationstechniken</b>	<b>12</b>
2.2.4.1 Vorbereitung der Tiere	12
2.2.4.2 Versorgung der Tiere während der Operation	13
2.2.4.3 Transplantations-Technik: Nierenkapsel	13
2.2.4.4 Transplantations-Technik: Lebervene	13
2.2.4.5 Implantation osmotischer Pumpen	14
2.2.4.6 Nachsorge der Tiere	14
<b>2.2.5 Applikationsformen der Medikamente</b>	<b>15</b>
<b>2.2.6 Messung der Transplantatfunktion</b>	<b>15</b>
2.2.6.1 Körpergewicht	15
2.2.6.2 Serumglukose	15
<b>2.2.7 Organentnahmen</b>	<b>16</b>
2.2.7.1 Nephrektomie	16
2.2.7.2 Pankreatektomie und Heparektomie	16
<b>2.2.8 Insulinwiederfindung</b>	<b>17</b>
2.2.8.1 Organvorbereitung	17

Inhaltsverzeichnis	II
2.2.8.1.1 Niere	17
2.2.8.1.2 Pankreas	17
2.2.8.1.3 Leber	17
2.2.8.2 Insulin-Enzym-Immunoassay	18
2.2.8.3 Ratteninsulin-Radio-Immunoassay	18
<b>2.2.9 Nitrit/Nitrat-Bestimmung im Rattenserum</b>	19
<b>2.2.10 Hitzeschockproteine</b>	20
2.2.10.1 Induktion	20
2.2.10.2 Nachweis durch Westernblot	20
2.2.10.3 In-vitro-Qualitätskontrollen	21
2.2.10.4 Evaluierung der Stressresistenz	21
2.2.10.4.1 In-vitro	21
2.2.10.4.2 In-vivo	22
<b>2.2.11 Statistische Verfahren</b>	22
 <b>3. ERGEBNISSE</b>	 23
<b>3.1 Vergleich der subkapsulären und intraportalen Inseltransplantation bei diabetischen, athymischen Ratten</b>	23
3.1.1 Transplantatfunktion	23
3.1.2 Nitrit/Nitrat-Bestimmung im Empfängerserum	25
<b>3.2 Antiinflammatorische Strategien nach intraportaler Inseltransplantation in athymische Ratten</b>	26
<b>3.2.1 Behandlung mit selektiven und unselektiven iNOS-Inhibitoren</b>	26
3.2.1.1 Transplantatfunktion	26
3.2.1.2 Bestimmung des endogenen Insulins im Empfängerpankreas	28
3.2.1.3 Nitrit/Nitrat-Bestimmung im Empfängerserum	29
<b>3.2.2 Behandlung mit Nikotinamid</b>	30
3.2.2.1 Transplantatfunktion	30
3.2.2.2 Nitrit/Nitrat-Bestimmung im Empfängerserum	32
3.2.2.3 Bestimmung von endogenem Insulin im Empfängerpankreas	33
<b>3.2.3 Einfluss von Hitzeschockproteinen auf die inflammatorische Resistenz isolierter Schweineinseln</b>	34
3.2.3.1 Induktion von HSP-70	34
3.2.3.1.1 Expositionsdauer	34



3.2.3.1.2	Regenerationsdauer	34
3.2.3.2	Qualitätskontrollen	35
3.2.3.3	Inkubation mit Natrium Nitroprusside oder Wasserstoffperoxid	36
3.2.3.4	Insulinwiederfindung nach Transplantation von scheinbehandelten bzw. hitzeexponierten Schweineinseln unter die Nierenkapsel nicht diabetischer, euthymischer Ratten	37
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>39</b>
<b>4.1</b>	<b>Vergleich der subkapsulären und intraportalen Transplantation</b>	<b>40</b>
<b>4.2</b>	<b>Hemmung der iNOS</b>	<b>41</b>
<b>4.3</b>	<b>Nikotinamid</b>	<b>42</b>
<b>4.4</b>	<b>Hitzeschockproteine</b>	<b>45</b>
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>48</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>50</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>51</b>
<b>8.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>66</b>



## 1. EINLEITUNG

Der Diabetes mellitus (DM) ist eine chronische Erkrankung des gesamten Stoffwechsels, die durch einen absoluten oder relativen Insulinmangel charakterisiert ist. Man unterscheidet dabei primäre und sekundäre Formen. Nach einer WHO-Klassifikation werden DM und Glukosetoleranzstörungen in verschiedene Klassen eingeteilt, wobei insbesondere der Typ-I- und Typ-II-DM von praktischer und klinischer Bedeutung sind [151].

Die primäre Form umfasst den Typ-I- und Typ-II-DM. Der Typ-I-DM, insulinabhängige Form DM (insulin dependent diabetes mellitus = IDDM), entsteht durch eine gezielte Zerstörung der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen des Pankreas aufgrund einer genetischen Prädisposition des Immunsystems. Der IDDM, auch jugendlicher Diabetes genannt, ist gekennzeichnet durch einen teilweisen oder kompletten Mangel an Insulinproduktion und tritt vorwiegend im Kindes- und Jugendalter auf. Der Typ-II-DM, auch als insulinunabhängiger DM (non insulin dependent diabetes mellitus = NIDDM) genannt, tritt vorwiegend im Erwachsenenalter auf (Altersdiabetes) und ist durch eine verzögerte Insulinsekretion und eine gestörte Insulinwirkung am Zielorgan gekennzeichnet.

Die sekundären Diabetesformen treten z.B. nach Pankreaserkrankungen, Pankreatektomie, Lebererkrankungen und Hämokromatose auf, sowie bei Krankheiten, die mit einer Hypersekretion kontrainsulinärer Hormone einhergehen [141].

Noch vor wenigen Jahrzehnten standen die akuten diabetischen Wechselstörungen im Vordergrund der diabetischen Gesundheitsproblematik. Heute wird das Augenmerk insbesondere auf die Vorbeugung der Entwicklung diabetischer Folgeschäden, vor allem in Form der Mikro- und Makroangiopathie, gerichtet [131]. Die Entwicklung dieser diabetischen Spätschäden an größeren und kleineren Gefäßen hängt im Wesentlichen von der Qualität der langfristigen Stoffwechseleinstellung ab [141].

Hauptursache der Mikroangiopathie ist die permanente Hyperglykämie, die in einer vermehrten Glykosylierung von Proteinen, messbar durch glykosylierten Hämoglobin A<sub>1</sub> (HbA<sub>1c</sub>), resultiert. Als Folge kommt es in den Glomeruli der Niere zu veränderten spezifischen Funktionen (Nephropathie), bis zum vollständigen Verlust der Nierenfunktion [22, 82]. In Deutschland sind ein Drittel aller Fälle des chronischen Nierenversagens die

Folge von DM. Als weitere Folge der Mikroangiopathie ist die diabetische Retinopathie die häufigste Ursache von Erblindung [131].

Makroangiopathien der mittleren und größeren Gefäße gleichen der Arteriosklerose bei Nicht-Diabetikern, mit Manifestationsfaktoren wie z. B. Adipositas und häufig durch Diabetes hervorgerufene Lipoproteinämien. Mögliche Folgen sind koronare und arterielle Verschlusskrankheiten wie Angina pectoris, Herzinfarkt und Schlaganfall [22, 82]. Etwa 75% aller Todesfälle bei Diabetikern sind auf kardiovaskuläre Erkrankungen zurückzuführen [127].

In den westlichen Industrieländern sind etwa 4-5 % der Gesamtbevölkerung mit steigender Tendenz an DM erkrankt [65]. Die WHO schätzt, dass die Zahl der Diabetiker in den kommenden 25 Jahren um mehr als 40 % zunehmen wird. Den Krankenkassendaten zufolge leiden gegenwärtig etwa fünf Millionen Menschen in Deutschland an DM, wovon ungefähr 200.000 Patienten am Typ-I-DM erkrankt sind [139].

Ziel und Aufgabe der Diabetestherapie ist es, eine Normalisierung des diabetischen Glukosestoffwechsels zu erreichen und somit das Auftreten von akuten und chronisch bedingten Komplikationen zu vermeiden. Eine langfristig gute Stoffwechseleinstellung kann die Folgeschäden dieser Krankheit verhindern oder zumindest hinauszögern und somit Lebenserwartung und -qualität erhöhen [84]. Dies kann zunächst durch Insulintherapie, verbunden mit einer Diät und körperlichen Aktivitäten und bei Typ-II-Diabetikern eventuell durch die Anwendung oraler Antidiabetika [141], sowie neuerdings auch durch eine Pankreas- oder Inseltransplantation [20], erreicht werden.

Die therapeutische Maßnahme mit der Einführung konventioneller Insulintherapie führte zu keiner ausreichenden Normalisierung des Blutzuckerspiegels [19]. Bei der funktionellen „flexiblen“, sogenannten intensivierten Insulintherapie, wird das Insulin nach Art, Dosis und Applikationspunkt dem überlegten oder spontanen Ernährungsverhalten angepasst [109]. Sowohl die Ergebnisse einer Meta-Analyse, in der verschiedene europäische Studien zusammengefasst wurden, als auch die einer prospektiven US-amerikanischen/kanadischen Studie an vielen Behandlungszentren zeigten, dass durch intensivierte Insulintherapie, Schulung und Selbstkontrolle, mit nachfolgend verbesserter Stoffwechseleinstellung, die diabetischen Spätschäden signifikant beeinflusst werden. Jedoch gilt dies nicht für fortgeschrittene Organschädigungen. Hierbei wurde im Durchschnitt auch nur eine Senkung

und keine Normalisierung des  $\text{HbA}_{1\text{C}}$  erreicht. Dabei verdreifachte sich die Zahl der Hypoglykämien, und es traten vermehrt Ketoazidosen in den Fällen von kontinuierlicher, subkutaner Insulintherapie auf [140, 146].

Der biologische Ersatz der erkrankten  $\beta$ -Zellen durch Transplantation (TX) des gesamten Pankreas oder durch Implantation isolierter Langerhansscher Inseln in die Leber ist zurzeit das einzige Therapieverfahren, mit dem eine Normoglykämie ohne die Gefahr lebensbedrohlicher Hypoglykämien bei Typ-I-Diabetikern zu erreichen ist [23, 96]. Nachteil dieser Therapieform ist die Belastung der Empfänger durch eine lebenslange immunsuppressive Behandlung mit den damit verbundenen Risiken. Aus diesem Grund wird ein  $\beta$ -Zellersatz durch TX bei schon immunsupprimierten, nierentransplantierten Diabetikern durchgeführt, bzw. simultan zusammen mit einer Nieren-TX realisiert. Eine weitere Indikation für einen operativen  $\beta$ -Zellersatz ist ein extrem schwer einstellbarer Brittle Diabetes oder rezidivierende schwere Hypoglykämien, die mehrfach pro Jahr auftreten [20].

Durch eine Pankreas-TX werden langfristig die Progression von diabetischen Sekundärkomplikationen, bedingt durch eine gute Stoffwechsellage, gehemmt [41, 77, 100, 101] und somit eine längere Lebenserwartung und -qualität erreicht [46, 95, 96]. Zwischen den Jahren 1987 und 1995 wurden weltweit über 5500 Pankreas-TX mit einer 91 %igen 1-Jahres-Überlebensrate der Patienten nach simultaner Pankreas-Nieren-TX durchgeführt [92].

Die TX des gesamten Pankreasorgans ist im Vergleich zur Insel-TX aufgrund des größeren chirurgischen Eingriffs mit höheren Komplikationsraten und Risiken verbunden [21]. Ein weiterer Vorteil einer TX isolierter Inseln gegenüber Pankreasorgan-TX besteht darin, dass durch eine in-vitro-Vorbehandlung die Immunogenität und Antigenität der zu transplantierenden Inseln reduziert werden kann [17]. Würde es gelingen, Humaninseln ohne die Notwendigkeit einer permanenten Anwendung von Immunsuppressiva bei entsprechend disponierten Patienten zu transplantieren, könnten diabetes-spezifische Spätschäden schon vor ihrem Auftreten vermieden werden [58]. Das Problem des Wiederauflebens der  $\beta$ -Zell-spezifischen Autoimmunität nach Insel-TX bei Wegfall der permanenten Immunsuppression ist allerdings noch ungelöst [57, 132].

Die intraportale Insel-TX wurde wegen des chirurgischen Vorteils und Metabolisierung des sezernierten Insulins für autologe oder allogene Humaninseln favorisiert [53]. Daten der Edmontongruppe zeigen deutlich, dass eine langfristige Insulinunabhängigkeit nach intraportaler Insel-TX nur nach Infusion einer sehr großen Inselmenge, isoliert aus bis zu vier Pankreata, zu erreichen ist [119, 120, 128]. Die erforderliche Inselmasse für eine langfristige Insulinunabhängigkeit wird durch die Auswahl der Leber als ein stark proinflammatorisches Organ erhöht [54]. Tierversuche hierzu belegen, dass die sofortigen inflammatorischen Reaktionen des Empfängers gegenüber dem Inseltransplantat, die nicht durch Immunsuppressiva zu kontrollieren sind, hierbei eine wichtige Rolle spielen [18]. Die Experimente mit Nagern weisen deutlich nach, dass ortsständige Lebermakrophagen (Kupffer-Stern-Zellen) und endotheliale Zellen mittels Zytokinsekretion und/oder Aktivierung der induzierbaren Stickoxid-Synthase (iNOS) eine frühe Inseldysfunktion vermitteln können [11, 74, 133, 134, 156]. Die rasche Aktivierung der iNOS, verbunden mit einer signifikanten Zunahme des Serum-Nitrat-Spiegels, scheinen auch im hepatischen, intraportalen Mikromilieu in Inseltransplantierten Patienten eine signifikante Rolle zu spielen [135].

Der große Bedarf an Spenderpankreata, der aus diesem Mechanismus resultiert, ließe sich bei Ausdehnung der Indikation auf weitere Empfängerpopulationen nur noch durch Spenderorgane anderer Spezies, z. B. des Schweins, decken [20, 30, 66].

Aufgrund der großen Ähnlichkeiten hinsichtlich der Physiologie, Organgröße und des Insulinmetabolismus [15, 29, 32, 47] stellt das Schwein ein sehr attraktives Model für vorklinische Studien, aber auch als potenzielles Spendertier für zukünftige klinische Xeno-TX dar, wenn die gegenwärtigen Bedenken aus virologischer Sicht beseitigt werden [108]. Hinsichtlich des Wiederauflebens der Autoimmunreaktionen liegen aus tierexperimentellen Studien mit spontandiabetischen NOD-Mäusen eindeutige Hinweise auf eine wesentlich geringere Gefahr der Autoimmunzerstörung des Transplantats nach porziner, xenogener Insel-TX als nach allogener Insel-TX vor [88].

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, antiinflammatorische, adjuvante Protokolle zu entwickeln, die eine Reduktion der unmittelbaren, unspezifischen Immunreaktionen nach intraportaler Insel-TX erlauben und die Überlebensrate von Inseltransplantaten erhöhen.

Zu diesem Zweck wurden diabetische, athymische (T-Zelldefiziente) Nacktratten als Empfänger ausgewählt und nach Diabetes-Induktion mit frisch isolierten, adulten Schweineinseln intraportal transplantiert. Dieses TX-Modell ermöglicht die längerfristige Beobachtung der Funktion von xenogenen Inseltransplanten in einem inflammatorischen Milieu ohne durch reaktive T-Lymphozyten [50] beeinflusst zu werden.

Zur Reduktion der unmittelbaren, unspezifischen Immunreaktionen wurden hierbei zwei unterschiedliche Strategien verfolgt:

### 1. Inhibierung von iNOS durch hochspezifische Substanzen

Hierzu wurden die Wirksamkeit von zwei hochspezifischen Isothioureaten, S-Methyl-Isothioureat (SMT) und S-(2-Aminoethyl)-Isothioureat (AE-ITU), mit dem unselektiven Argininanalogon L-N<sup>G</sup>-Monomethyl-Arginin (L-NMMA) und dem Steroid Dexamethason (DXM) erstmalig in ihrer Wirksamkeit nach Insel-TX verglichen.

### 2. Steigerung der Resistenz isolierter Inseln gegenüber inflammatorischen Mechanismen

Vergleichende Untersuchungen haben gezeigt, dass die Expressionsrate von verschiedenen, antioxidativen Schutzmechanismen in Inseln im Vergleich zu anderen Geweben am niedrigsten sind [2, 44, 83, 87]. Antiinflammatorische Maßnahmen könnten daher für das Überleben implantierter Inseln während der Inflammation und Autoimmunreaktionen von essentieller Bedeutung sein.

#### 2.1 Applikation von hochdosiertem Nikotinamid

Obwohl anhand zahlreicher Studien an Nagern demonstriert wurde, dass Nikotinamid (NA) Inseln vor der Autoimmunreaktion während der Diabetesentwicklung [157] bzw. vor chemisch induziertem Diabetes [80, 143] und während der inflammatorischen Reaktionen nach syngener Insel-TX [70, 98, 144] schützt, wurden bisher noch keinerlei Daten über die protektive Wirkung von NA hinsichtlich transplanterter Großtierinseln erhoben.

## 2.2. Induktion von Hitzeschockproteinen

Als Bestandteil eines ubiquitären Schutzmechanismus und als Antwort auf schädliche Umweltbedingungen [148] sind Hitzeschockproteine (HSPs) an endogenen Schutz- bzw. Reparaturprozessen an ribosomalen Strukturen beteiligt [114, 149]. An Ratten konnte gezeigt werden, dass eine induzierte Überexpression von HSP-70 isolierte Inselzellen vor inflammatorischen Mediatoren wie IL-1 $\beta$ , NO, O<sub>2</sub>-Radikalen und Streptozotocin (STZ) schützt [7, 8, 90]. Über die antiinflammatorische Wirkung einer HSP-Vorbehandlung in Großtierinseln vor TX wurden bisher keine Studien durchgeführt.



## 2. MATERIALIEN UND METHODEN

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Reagenzien

Alkohol (80%, 96%, 99.6%)	Kliniksapotheke, Universitätsklinikum, Gießen
Aqua destillata	Kliniksapotheke, Universitätsklinikum, Gießen
Assay-Puffer	Kliniksapotheke, Universitätsklinikum, Gießen
Braunol, 03864154	Braun, Melsungen
Fetal Calf Serum (FCS), Charge 30Q9680,011-06290M	Gibco, Eggenstein
Formalin (4%)	Kliniksapotheke J.-L.-U. Gi, Gießen
Glucose Reagenz+Standard, 671640	Beckman Instr. GmbH, München
Glycerin (87%), 4094.500	Merck, Darmstadt
Hanks' Balanced Salt Solution (10x konz.), L2025	Biochrom/Seromed, Berlin
Hepes Buffer Solution (1M), 043-05630H	Biochrom/Seromed, Berlin
Kaliumsorbat, 5118	Merck, Darmstadt
Kochsalzlösung (0,9%), 1158275	Pharmacia & Upjohn, Erlangen
Medim-Plast®, 10-0005	Medim Histotechnologie, Gießen
Medium-199 (10x konz.), w/o Carbonate, 042-01180M	Gibco, Eggenstein
N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamine (200mM), K0202	Biochrom/Seromed, Berlin
NaCl, 3957.1	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat, 8.4%, 546496A	Braun, Melsungen
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 6580	Merck, Darmstadt
NaNO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt
n-Butylacetat, 1.01974.2500	Merck, Darmstadt
Natrium-Nitroprusside, MG 298	Biochrom/Seromed, Berlin
Non-fat-dried-milk	Sigma, Deisenhofen
Phenolrotindikator, L2033	Biochrom/Seromed, Berlin
Phosphorsäure (1mol/L), 85%	Kliniksapotheke, Universitätsklinikum, Gießen
RPMI 1640	Gibco, Eggenstein
STZ, Charge: 16H1071/17H0653, S-0130	Sigma, Deisenhofen
Tetracyclin, Lot 96H1177, T3383	Sigma, St. Louis,USA
Titrisol®, 1N HCL, 109970	Merck, Darmstadt
Trypanblau (0,5%), 47285	Serva, Heidelberg
Wasserstoffperoxid, MG 34.1	Biochrom/Seromed, Berlin

#### 2.1.2 Kit-Systeme

Alexis-Kit, 850-001-KID1	Alexis, Grünberg
Insulin MTPL EIA, XD 4025	DRG Instruments GmbH, Marburg
Rat-Insulin RIA, DRLRI13K J- <sub>125</sub>	DRG Instruments GmbH, Marburg

### 2.1.3 Antikörper

#### 1. Primärantikörper (monoklonal von der Maus)

Anti-Actin-, 137899	Boehringer, Mannheim
Anti-Human-HSP70-	Boehringer, Mannheim
Anti-Human-Hämoxygenase- (HO-1)	Dianova, Hamburg

#### 2. Sekundärantikörper (peroxidasekonjugiert)

Anti-Maus-	Dako, Glostrup, Dänemark
------------	--------------------------

### 2.1.4 Medikamente

AE-ITU, Charge: 270-030-M050	Alexis Corporation, San Diego, USA
DXM, Fortecortin® Mono 4, 7873350057	Merck, Darmstadt
L-NMMA, M7033	Sigma, St. Louis, USA
NA, N-3376	Sigma, St. Louis, USA
Penicillin-Streptomycin, Charge 15F0400, 043-05140	Gibco, Eggenstein
SMT, Charge: 270-027-M250, L00720	Alexis Corporation, San Diego, USA

### 2.1.5 Narkotika

Äther, A254	ASID Bonz GmbH
Metofane®	Janssen-Cilag, Neuss
Narcoren®, N208	Rhône, Merieux, Laupheim

### 2.1.6 Zusammensetzung häufig benutzter Lösungen und Puffer

HBSS (Hanks' balanced salt solution):

- 10mL Penicillin-Streptomycin
- 100mL HBSS (10x)
- ca. 3-5 mL Natriumhydrogencarbonat
- unter sterilen Bedingungen mit Aqua destillata ad 1L auffüllen

Insulin-Extraktions-Reagenz nach Ziegler [161]:

- 76mL Äthanol (96%)
- 8mL  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (1M)
- 4mL Aqua destillata
- (bei 4 °C aufbewahren)

#### IRI-Puffer:

- 4.7g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- 6g NaCl
- 3g Humanalbumin
- 0.2g  $\text{NaN}_3$
- ad 1.000mL Aqua destillata
- (bei 4 °C aufbewahren)

#### Medium 199:

- 900mL Aqua destillata
- 100mL Medium 199 (10x konz.)
- 20mL Hepes
- 10mL N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamine
- 10mL Penicillin-Streptomycin
- 0.45mL NaOH (10mol/L)
- 50mL Fetal Calf Serum (FCS)

#### Natrium-Nitoprusside-Lösung (1.5mM):

- 60mg Nitoprusside-Na
- ad 12mL Kulturmedium
- (frischen Ansatz nach Gebrauch verwerfen)

#### SDS-Puffer:

- 100 $\mu\text{L}$  Glycerol
- 125 $\mu\text{L}$  Tris Puffer (0.5M, pH 6,8)
- 200 $\mu\text{L}$  SDS Gel (10%)
- 475 $\mu\text{L}$  Aqua destillata

#### Trinkwasser für Nacktratten:

- 1350mg Kaliumsorbat
- 300mg Tetracyclin

- ad 1.000mL steriles Leitungswasser
- mit 6N HCL (Titrisol®) auf pH 2,5 einstellen

Wasserstoffperoxid-Lösung (6mM):

- 30  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$
- ad 45mL Kulturmedium
- (frischen Ansatz nach Gebrauch werfen)

Alle übrigen, verwendeten Arbeitsmaterialien und Geräte werden im jeweiligen Methodenkapitel erwähnt.

## **2.2 METHODEN**

### **2.2.1 Gewinnung und Isolierung der Schweineinseln**

Als Spendertiere für Pankreata, dienen weibliche Zuchtschweine im Alter >2 Jahren, die aufgrund mangelhafter Fertilität und körperlicher Gebrechen aus der Zucht ausgeschlossen wurden. Die Resektion des Pankreas erfolgt innerhalb einer warmen Ischämiezeit (von ca. 10-15 Min. post mortem). Nach Entnahme erfolgt die Aufbewahrung des Organs bis zur Inselisolierung in eiskühlter physiologischer Kochsalzlösung.

Die Inseln werden nach einer modifizierten Digestions-Filtrations-Methode nach Brandhorst et al. [16] aus dem Schweinepankreas isoliert und über einen diskontinuierlichen Ficoll-Gradienten gereinigt. Die isolierten Inseln werden nach Durchmesser, auf eine Standardinselgröße (IEQ) von 150 µm bezogen [16], quantifiziert und anschließend in Kulturmedium (RPMI 1640+20% Schweineserum) in Petrischalen aliquotiert.

### **2.2.2 Haltung der Versuchstiere**

Für die vorliegenden Studien werden männliche, immunkompetente (-/-) Lewis-Ratten (Fa. Møllegaard, Lille Skensved, Denmark) und thymusaplastische, männliche, homozygote Lewis-Nacktratten (rnu/rnu) (Fa. Møllegaard, Lille Skensved, Denmark) im Alter von 5-6 Wochen als Empfänger von Schweineinseln verwendet.

Die Haltung der Ratten erfolgt in Standardkäfigen (Plastikkasten mit Metallgitter, Fa. Ebeco, Castrop-Rauxel) auf Sägespäne. Wasser und Futter (Altromin, Fa. Altromin Tierlaborservice, Lage-Lippe) werden ad libitum verabreicht. Die Haltung der thymusaplastischen Nacktratten erfolgt in Isolierung zur restlichen Kolonie unter sauberen aber nicht sterilen Bedingungen wobei die Käfige mit Luftfiltern (Fa. Ebeco, Castrop-Rauxel) abgeschlossen werden. Sägespäne, Wasser und Futter werden autoklaviert.

Eine Umgebungstemperatur von 23°C - 26°C sollte nicht unterschritten werden. Manipulationen an den Tieren werden ausschließlich mit Mundschutz und Handschuhen durchgeführt.

### 2.2.3 Diabetesinduktion

Die Tiere werden hierfür 4-5 Tage vor Transplantation mit numerischen Ohrmarken individuell gekennzeichnet. Das Körpergewicht (digitale Haushaltswaage, Fa. Soehnle), sowie der aktuelle Glukosegehalt des Blutes (Glucose-Analyzer 2, Fa. Beckman, München) wird bestimmt. Die Tiere werden anschließend einmalig mit frisch angesetzter Streptozotocin-Lösung (Ansatz und Charge: s. u.) intravenös in die laterale Schwanzvene behandelt.

Dosierung wird hierbei abhängig von der jeweiligen Spezies nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{X * KGW[kg]}{15} = \text{STZ - Lösung}[ml] \qquad \text{Nackt-Ratte: } X=80-85$$

Herstellung der STZ-Lösung: Streptozotocin in ein 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß abwiegen und unmittelbar vor Verbrauch in 1ml steriler physiologischer NaCl-Lösung durch starkes Schütteln lösen.

Lediglich Tiere mit einem Serumglukose-Spiegel >300 mg/dl werden als diabetisch betrachtet und für die Studie eingesetzt.

### 2.2.4 Transplantationstechniken

#### 2.2.4.1 Vorbereitung der Tiere

Vor der Operation (OP) bestimmen wir Körpergewicht und Blutzucker. Die anschließende Betäubung wird durch eine, in einem PPN-Röhrchen (Vol. 50 mL, Fa. Greiner, Frickenhausen), mit Metofane durchtränkte Mullkompressen (Fuhrmann, Neunkirchen) eingeleitet. Die Tiere werden, abhängig von der Operationstechnik links lateral am Abdomen auf einer Fläche von 2x2 cm (subkapsuläre TX) bzw. dorsal am Abdomen auf einer Fläche von 3x3 cm (intraportale TX) rasiert. Für die Implantation von osmotischen Pumpen (Alza Corp., Palo Alto) wird zusätzlich zwischen den Schulterblättern eine Fläche von 2x3 cm rasiert.

#### 2.2.4.2 Versorgung der Tiere während der Operation

Zur Sicherung der Körpertemperatur während der OP werden folgende Maßnahmen ergriffen. Lagerung der Tiere auf temperaturstabilem Untergrund bei 35°C-40°C. Hier wird ein erwärmtes Thermoelement verwendet. Erwärmung sämtlicher am Tier verwendeter Lösungen auf ca. 40°C. Die Narkose wird durch zeitweilige Metofane-Inhalation der Tiere während der OP in der gewünschten Tiefe gehalten.

#### 2.2.4.3 Transplantations-Technik: Nierenkapsel

Die Tiere werden so auf die OP-Fläche gelegt, dass sich die rasierte Flanke des Tieres offen vor dem Operateur befindet. Nach Desinfektion (Braunol) der Flanke wird ein dorsolateraler Schnitt einen Finger breit caudal der letzten Rippe über der Niere geführt. Durch leichten Druck wird diese vorsichtig nach außen luxiert und mit Hilfe von Wattestäbchen in ihrer Position gehalten. Während der weiteren OP wird die Niere kontinuierlich mit isotonischer Kochsalzlösung befeuchtet. Die, in Kulturmedium suspendierten Schweineinseln werden mit einer Kolbenhubpipette (Fa. Eppendorf, Hamburg) aufgenommen, in ein Zentrifugengefäß mit Deckel (Vol. 0,4 mL, Fa. Eppendorf, Hamburg) überführt und zentrifugiert (1 Min./650xg). Der Überstand wird verworfen und das Gewebepellet in eine Hamiltonspritze (Fa. Hamilton, Bonaduz) aspiriert. Das Suspensions-Volumen beträgt ca. 40 µl.

An der dorsalen Seitenfläche beginnend wird die Rattenniere in der Medianebene mit der vorbereiteten Hamilton-Spritze punktiert, sodass die Nadelspitze an der ventralen Seitenfläche unter der Nierenkapsel zu liegen kommt, ohne diese zu verletzen. Die Inseln werden langsam unter die Kapsel injiziert, wobei das Volumen der Suspension so gering wie möglich gehalten wird, um ein Sprengen der Kapsel durch Überdruck zu vermeiden. Die Kontrolltiere der jeweiligen Versuchsgruppe erhalten entsprechend 0.9%ige NaCl-Lösung anstatt des Inselclusters (= Schein-TX). Sind die Inseln bzw. das NaCl plaziert, wird die Spritzenkanüle vorsichtig aus der Niere entfernt und das Organ rückverlagert.

#### 2.2.4.4 Transplantations-Technik: Lebervene

Die Tiere werden auf den Rücken gelegt. Das Operationsfeld, der Bauch-Becken-Bereich wird desinfiziert. Mit einer spitzen Schere wird dort ein ca. 3 cm langer Schnitt von caudal nach cranial

entlang der „Linea alba“ bis in Höhe des Brustbeinknorpels geführt. Aus der Öffnung werden nun Dünndarm, Dickdarm und Blinddarm ausgelagert und in eine sterile, mit isotonischer Kochsalzlösung befeuchtete Mullkompressen (steril, 10x13cm, Fuhrmann, Neunkirchen) eingeschlagen. Diese wird während der weiteren Operation kontinuierlich mit physiologischer Kochsalzlösung feucht gehalten. Die in Kulturmedium suspendierten Schweineinseln werden mit einer Einmalspritze (Vol. 1 mL, Fa. Braun, Melsungen) aspiriert, sodass sich zwischen Insel-suspension und Stempel ein Luftpolster befindet. Die Spritze wird dann auf ein „Micro-perfusore Infusionset“ (=Butterfly) aufgesetzt, dessen Schlauchsystem luftblasenfrei mit Hanks' Medium gefüllt ist. An der viszeralen Leberfläche befindet sich, umschlossen vom Pankreas die Vena portae. Mit dem vorbereiteten Butterfly wird diese leberwärts punktiert und die Inselsuspension langsam injiziert. Die Blutung nach Entfernen des Butterflies wird mit einem Streifen Tachotop (Hämostyptikum, Fa. Nycomed) gestillt. Anschließend werden alle Organe erneut befeuchtet und rückverlagert.

#### 2.2.4.5 Implantation osmotischer Pumpen

Die osmotischen Pumpen (Alzet Model 2ML1, Alza Corp., Palo Alto) werden steril mit dem, in 0,9%iger NaCl bzw. Puffer gelösten, zu verabreichenden Medikament (Kap. 2.2.5) befüllt.

Die narkotisierten und rasierten Tiere befinden sich für die Implantation in Bauchlage.  $\frac{1}{2}$  cm lateral der Medianebene wird beginnend vom Nacken nach caudal über die Schulterblätter ein 2cm langer Hautschnitt mit einer spitzen Schere durchgeführt. Die Haut wird vom Untergrund stumpf abpräpariert, sodass eine Hauttasche entsteht, in welche die Pumpe subkutan eingebettet wird.

#### 2.2.4.6 Nachsorge der Tiere

Am Ende jeder TX werden nach Rückplatzierung der Organe bzw. Implantation der osmotischen Pumpe die Muskeln und Fascien mit resorbierbarem chirurgischen Nahtmaterial (Fa. Ethicon, Norderstedt) adaptiert sowie die darüberliegende Haut mit Wundklammern (Michelklammern, Fa. Schilder, Gießen) verschlossen. Nach Auflegen eines Sprühverbandes verbleibt das Tier bis zum Aufwachen isoliert in einem Käfig unter Infrarotlicht.



### 2.2.5 Applikationsformen der Medikamente

Tab. 1: Applizierte Medikamente und ihre Dosierung.

Medikament	Dosierung [mg/kg/Tag]	i.p. Injektion	osmot. Pumpe
LNMA	200		X
Nikotinamid	500		X
	1.000		X
Dexamethason	20	X	
AE-ITU	50		X
SMT	100		X

(Dexamethason wird am Tag -1 und am Tag 0 bezogen auf den TX-Zeitpunkt appliziert.)

### 2.2.6 Messung der Trasplantatfunktion

#### 2.2.6.1 Körpergewicht

Das Körpergewicht der xenogenen Empfängertiere wird direkt vor der OP mit einer digitalen Haushaltswaage bestimmt. Nach Durchführung der TX wird dieser Stoffwechselfparameter in der ersten Woche post operationem täglich, danach alle zwei Tage vormittags zur gleichen Uhrzeit gemessen.

#### 2.2.6.2 Serumglukose

Die Serumglukosekontrolle findet im gleichen Rhythmus wie die Körpergewichtskontrolle der Tiere statt. (Kap. 2.2.6.1.). Bei den Nacktratten ist bei allen Manipulationen auf das Einhalten von sauberen Bedingungen zu achten.

Mit einem 300 µl-Kapillargefäß (Microvette CB300, Fa. Sarstedt, Nümbrecht) wird an der lateralen Schwanzvene Blut aspiriert und für 4 Min. in einer Mikroliter-Ultrazentrifuge (Fa. Hettich, Tuttlingen) zentrifugiert. Der Glukosegehalt des Serums wird mit einem geeichten Glukose-Analysator (Beckman Instruments GmbH, München) bestimmt.

## **2.2.7 Organentnahmen**

### **2.2.7.1 Nephrektomie**

Kann nach TX ins diabetische Tier eine anhaltende Normoglykämie des Empfängers über den gesamten Beobachtungszeitraum festgestellt werden, wird als Kontrolle eine Entnahme des Transplantats durchgeführt. Die Vorbereitung des Tieres sowie die Versorgung während der OP erfolgt wie unter Kap. 2.2.4.1. und 2.2.4.2 beschrieben.

Das Organ wird nach außen luxiert. Nierenarterie und -vene sowie der Ureter werden am Nierenhilus mit einer Arterienklemme bzw. einem chirurgischen Faden zunächst ligiert und anschließend mit einer spitzen Schere durchtrennt. Zuletzt wird die Klemme entfernt. Wundverschluss und -versorgung entsprechen Kap. 2.2.4.6.

Serumglukose und Körpergewicht werden für weitere 7 Tage protokolliert. Die Tötung der Tiere erfolgt durch eine Überdosis Narkotikum (Narcoren®). Das entnommene Organ wird für die Insulinwiederfindung (Kap. 2.2.8) vorbereitet.

### **2.2.7.2 Pankreatektomie und Heparektomie**

Um eine Evaluierung der verbliebenen eingewachsenen, ursprünglich transplantierten Inselmasse durchzuführen, werden die Zielorgane reseziert. Zur Abschätzung der Regeneration des empfangereigenen Inselapparates wird dem Empfänger darüber hinaus auch das Pankreas entnommen. Hierzu wird das Tier zunächst narkotisiert, entblutet, Pankreas und Leber wie folgt entnommen: Das Abdomen wird entlang der „Linea alba“ von kaudal nach kranial mit einer spitzen Schere eröffnet, nach lateral werden Entlastungsschnitte gesetzt. Das Pankreas befindet sich im Dorsalbereich der Bauchhöhle in enger Beziehung zum Duodenum. Von dort wird es zügig abpräpariert und sofort auf Eis gekühlt. Zur Leberentnahme sucht man die Kaudalfäche der Zwerchfellkuppel auf, durchtrennt Gefäße und Speiseröhre und präpariert von dort ausgehend vorsichtig die Leber heraus. Das Organ wird sofort auf Eis gekühlt.

## 2.2.8 Insulinwiederfindung

### 2.2.8.1 Organvorbereitung

#### 2.2.8.1.1 Niere

Am vorliegenden Organ (Nephrektomie, Kap. 2.2.7.1) wird das Inseltransplantat aufgesucht und mit einem Skalpell ohne Verluste aus dem umgebenden Nierengewebe geschält.

#### 2.2.8.1.2 Pankreas

Das nach Kap. 2.2.7.2 entnommene Organ wird gewogen, das Gewicht protokolliert. Das Organ wird sofort nach Gewichtsbestimmung in ein Plastikröhrchen (Gewebe Kulturröhrchen, 12 mL, Fa. Greiner, Frickenhausen) mit vorbereiteten Mengen (Tab. 2) gekühltem Insulin-Extraktions-Reagenz gegeben und mit einem Ultra-Turrax T8 (Fa. Jonke&Kunkel GmbH, Staufen) homogenisiert. Zur Extraktion wird das Homogenisat auf einem Orbitalschüttler (Röhm Pharma GmbH, Darmstadt) bei 4°C mindestens 24 h inkubiert.

Danach erfolgt eine Sonifizierung jeder Probe mit je 5 kurzen Impulsen (Power +315; Cycle 0.25), anschließend Zentrifugation der Homogenisat-Proben (10 Min., 4°C, 3.000 xg). Zur Vorverdünnung der Proben wird für eine 1:10 Verdünnung (Tab. 2) 100 µL des Überstandes in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 900 µL IRI-Puffer neutralisiert. Diese Proben werden bis zur weiteren Messung bei -20°C tiefgefroren.

#### 2.2.8.1.3 Leber

Das nach Kap. 2.2.7.2 entnommene Organ wird gewogen, das Gewicht protokolliert. Man entnimmt aus jedem Leberlappen eine erbsengroße Stichprobe, wiegt und protokolliert das Gewicht. Die Organteile werden sofort nach Gewichtsbestimmung in ein Plastikröhrchen (Gewebe Kulturröhrchen, 12mL, Fa. Greiner, Frickenhausen) mit vorbereiteten Mengen (Tab. 2) gekühltem Insulin-Extraktions-Reagenz gegeben und mit einem Ultra-Turrax T8 (Fa. Jonke&Kunkel GmbH, Staufen) homogenisiert. Zur Extraktion wird das Homogenisat auf einem Orbitalschüttler (Röhm Pharma GmbH, Darmstadt) bei 4°C mindestens 24 h inkubiert.

Danach erfolgt eine Sonifizierung jeder Probe mit je 5 kurzen Impulsen (Power+315; Cycle 0.25), anschließend Zentrifugation der Homogenisat-Proben (10 Min., 4°C, 3.000 xg). Zur Vorverdünnung der Proben wird für eine 1:10 Verdünnung (Tab. 2) 100µL des Überstandes in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 900 µL IRI-Puffer neutralisiert. Diese Proben werden bis zur weiteren Messung bei -20°C tiefgefroren.

Tab. 2: Volumina, Verdünnungen, Messmethoden.

Organ	Volumen Ziegler-Lösung [ml]	Vorverdünnung IRI-Puffer	Messmethode
Niere	5	1:10	Insulin-Enzym- Immunoassay
Leber	20	1:10	Insulin-Enzym- Immunoassay
Pankreas	5	1:20	Ratten-Radio- Immunoassay

#### 2.2.8.2 Insulin-Enzym-Immunoassay

#### 2.2.8.3 Ratteninsulin-Radio-Immunoassay

Methoden zur quantitativen Bestimmung von Schweineinsulin in extrahierten Rattennieren /-lebern, bei transplantierten Versuchstieren (Insulin-Enzym-Immunoassay = Insulin-EIA) bzw. von Ratteninsulin in extrahierten Rattenpankreatata (Ratteninsulin-Radio-Immunoassay = Ratteninsulin-RIA).

Die Bestimmung wird im sogenannten EIA-Kit (DRG Instruments GmbH, Marburg) bzw. RIA-Kit (DRG Instruments GmbH, Marburg) nach Vorschrift durchgeführt. Dieser enthält alle benötigten Reagenzien, Materialien und Anweisungen.

### 2.2.9 Nitrit/Nitrat-Bestimmung im Rattenserum

Um eine Aussage über die Wirksamkeit der applizierten iNOS-Hemmer machen zu können wird eine Nitrit-Nitrat-Bestimmung im Rattenserum durchgeführt. Den Versuchstieren entnimmt man hierfür, vor der xenogenen Insel-TX, sowie 24 h bzw. 48 h nach der TX 500µL Blut aus der lateralen Schwanzvene in ein Reaktionsgefäß. Das durch Zentrifugation (10 Min./ 12.000 xg) gewonnene Serum wird bis zur weiteren Messung bei -20°C aufbewahrt. Um Interferenzen mit NH<sub>2</sub>-Gruppen von Proteinen zu vermeiden, werden diese durch Filtration mit einer 10 kDa-Ultrafiltrationseinheit (Centrex UF-0.5, 77759, Schleicher/Schüll, Dassel) abgetrennt. Die daraus entstehenden Filtrationsverluste werden als *Filtrationsrate*(%) berechnet.

#### Probenvorbereitung:

1. Wägung der 10 kD-Ultrafiltrationseinheit
  - a) Wägung (g) des Filtrationsröhrchens (FR), protokollieren
  - b) -“- des Filtereinsatzes (FE), protokollieren
2. Überführen von jeweils 200-250 µL Serum pro Filtrationseinheit
3. 1:2 Verdünnung mit Assay-Puffer und erneute Wägung, d.h. FR+FE+Serumprobe (SP), protokollieren
4. Zentrifugation für 30 Min. in der Ultrazentrifuge (12.000 xg)
5. Verwerfen des Filtrationseinsatzes (FE)

#### Berechnung der Prozentualen Filtrationsrate:

1. Wägung von FR+Filtrat (F)
2. Berechnung:

$$\text{Filtration (\%)} = \frac{(FR+F)-FR}{((FR+FE+SP)-FE-FR)} \times 100$$

#### Messung:

Der Nitrit/Nitrat Gehalt des Filtrats wird mittels eines Kits (Fa. Alexis, Grünberg) kolorimetrisch in einem Elisa Plate-Reader bei 405 nm gemessen.

## **2.2.10 Hitzeschockproteine**

### **2.2.10.1 Induktion**

Frisch isolierte, gereinigte Inseln werden in RPMI 1640+20% Schweineserum suspendiert, in Kulturflaschen gegeben und anschließend bei 43 °C-43.5 °C für 0, 30, 60, 90 oder 120 Min. einer Hitzebehandlung ausgesetzt.

Um die Kinetik der Stressprotein-Synthese zu überprüfen, werden die Inseln anschließend in verschiedenen Zeitintervallen von 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Als Kontrollwert dient die HSP-70-Expression in scheinbehandelten Inseln (37 °C).

### **2.2.10.2 Nachweis durch Westernblot**

Die jeweiligen Proben der hitzeexonierten und scheinbehandelten Inseln werden zunächst in kalter HBSS 3x gewaschen und anschließend in 500 µl SDS-Puffer suspendiert.

Nach Sonifizierung und Zentrifugation (Power +315, Cycle 0.25), (5 Min., 4 °C, 3077 xg) wird der Überstand in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

Die Proteine der Proben werden im SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Verfahren aufgetrennt und mittels blotten auf eine Nitro-Cellulose-Membran (Immobilon-Membran, Millipore, Molsheim, France) transferiert [142]. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wird die Membran zunächst 30 Min. mit einer 5%igen Non-fat-dried-milk in Phosphat-Puffer-Lösung (PBS) gesättigt, gewaschen und anschließend 90 Min. mit monoklonalen Maus-anti-Human-HSP70- bzw. monoklonalen Maus-anti-Actin-Antikörpern und Maus-anti-Human-Hämoxxygenase-Antikörpern (=Primärantikörper) inkubiert. In mehreren Arbeitsvorgängen wird die Membran gewaschen und anschließend mit peroxidasekonjugierten Anti-Maus-Antikörpern (=Sekundärantikörper) inkubiert. Im ECL-Detection-System (Amersham, Braunschweig) werden die markierten Antigen-Antikörper-Komplexe mittels Chemolumineszenz und durch Autoradiographie nachgewiesen.

Die Menge des exprimierten Hitzeschockproteins HSP-70 wird mit einem Densitometer-System (Hewlett-Packard, Rosenheim) gemessen und, bezogen auf das Inselgesamtprotein, bestimmt nach Ohnishi und Barr [105], als „area under curve“ berechnet.

#### 2.2.10.3 In-vitro-Qualitätskontrollen

##### Insulinsekretion:

Nach 24 h Kultivierung in RPMI-1640-Medium bei 37°C werden hitzeexponierten sowie scheinbehandelte Inseln mit 300 mg% Glukose in einer Inkubation über 90 Min. zur Insulinsekretion stimuliert. Die basale Glukosekonzentration beträgt 30 mg%.

Das sezernierte Insulin wird anschließend im Insulin-Enzym-Immuno-Assay (EIA) quantitativ bestimmt, wobei Humaninsulin als Standard verwendet wird. Der relative Stimulationsindex ergibt sich aus dem Verhältnis von stimulierter (16.5 mM Glukose) zu basaler (1.65 mM Glukose) Insulinausschüttung [115].

##### Viabilität:

Die Viabilität wird mittels Trypanblau gemessen, das selektiv membrangeschädigte Zellen anfärbt. Die Inseln werden hierfür in 0.5%iger Trypanblaulösung inkubiert, anschließend mit Medium 199 gewaschen. Abgeschätzt wird der prozentuale Anteil an Trypanblau-positiven Zellen gegenüber dem Gesamtzellvolumen individueller Inseln.

#### 2.2.10.4 Evaluierung der Stress-Resistenz

##### 2.2.10.4.1 In-vitro

5.000-10.000 IEQ werden in 10 ml RPMI 1640 suspendiert und bei 37°C für 20 h in 0,6 mM Wasserstoffperoxid H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder 1,5 mM Natrium-Nitroprusside (NNP) inkubiert.

Die Überlebensrate (%) wird mittels des ursprünglich eingesetzten Insulins (äquivalent zur Inselmenge) und die Viabilität (%) der hitzeexponierten Inseln und Kontrollgruppen werden nach folgender Formel abgeschätzt:

$$\frac{\text{Überlebensrate (Viabilität) 20h hitzeexponierter Inseln} \times 100}{\text{Überlebensrate (Viabilität) 20h scheinbehandelter Inseln (=Kontrollen)}}$$

#### 2.2.10.4.2 In-vivo

Quantifizierte Aliquots beider experimenteller Gruppen, d. h. hitzeexponierter und scheinbehandelter Schweineinseln (5.000-10.000 IEQ) werden simultan unter die kontralateralen Nierenkapseln derselben, nicht-diabetischen euthymischen Lewis-Ratte (Gewicht 250-300g, Møllegaard, Lille Skensved, Dänemark) transplantiert. Die Wiedergewinnung der ursprünglich implantierten Inselmasse wird mittels der Insulinextraktion nach Nephrektomie am Tag 2 post TX berechnet

#### 2.2.11 Statistische Verfahren

Die Datenauswertung erfolgt unter Verwendung des Statistiksoftwarepakets SPSS für Windows 6.1.3 (Copyright SPSS Inc., Chicago). Bei statistischen Tests unabhängiger Gruppen, wird aufgrund kleiner Gruppengrößen eine beliebige Verteilung der Messdaten vorausgesetzt. Bei einer Gruppenanzahl von mehr als zwei wird der Kruskal-Wallis-Test, bei paarweise durchgeführten Vergleichen der Mann-Whitney-Test eingesetzt. Ein Vergleich abhängiger Gruppen findet aus den gleichen Gründen mit dem Friedman-Test und dem Wilcoxon-Test (paarweise) statt. Ergeben sich signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0.05$ , wird ein multipler Vergleich mit dem Mann-Whitney bzw. dem Wilcoxon-Test durchgeführt. Eine Graduierung der Irrtumswahrscheinlichkeit wird nach dem, in der Literatur gebräuchlichen Signifikanzniveau vorgenommen [162]:

**Tab. 3:** Symbolisierung der Irrtumswahrscheinlichkeit bei statistischen Vergleichen

Irrtumswahrscheinlichkeit	Bedeutung	Symbol
$P > 0.05$	nicht signifikant	ns
$P \leq 0.05$	Signifikant	*
$P \leq 0.01$	hoch signifikant	**
$P \leq 0.001$	höchst signifikant	***



### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 Vergleich der subkapsulären und intraportalen Inseltransplantation bei diabetischen, athymischen Ratten

##### 3.1.1 Transplantatfunktion

Um die Transplantatfunktion in Abhängigkeit vom TX-Ort zu untersuchen, wurden 4.000 frisch isolierte Schweineinseln unter die Nierenkapsel bzw. in die Portalvene von diabetischen, athymischen Empfängern transplantiert. Als Kontrolle dienten diabetische, scheintransplantierte Tiere.

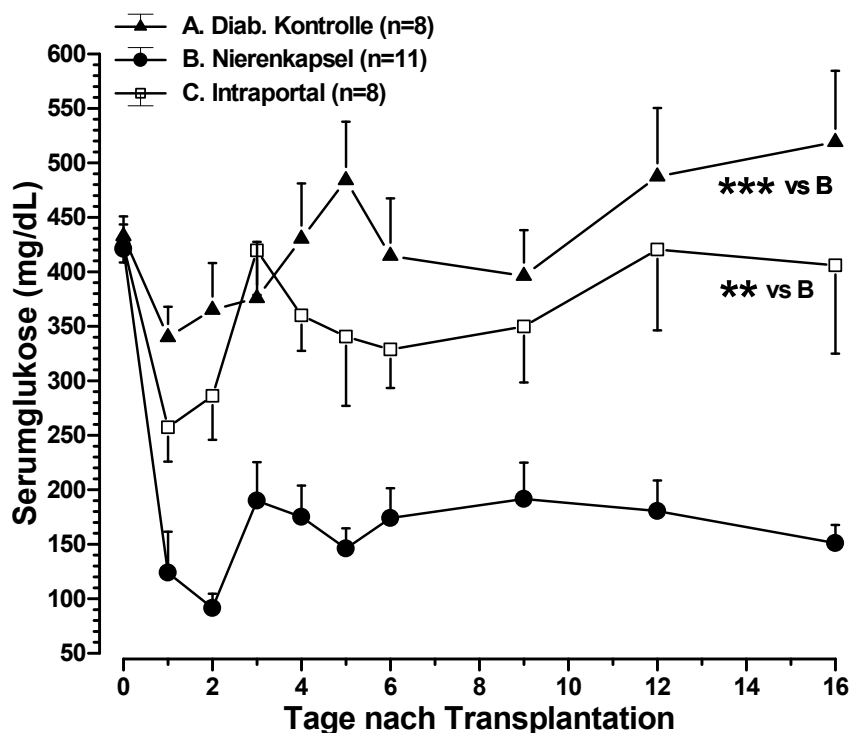


Abb. 1: Postprandiale Serumglukose nach TX von Schweineinseln in diabetische, athymische Ratten in Abhängigkeit vom TX-Ort (\*\*= $p < 0.01$ , \*\*\*= $p < 0.001$ ).

Die Implantation von isolierten Schweineinseln unter die Nierenkapsel bzw. in die Portalvene bei athymischen, diabetischen Ratten führte abhängig vom TX-Ort zu deutlich

unterschiedlichen Ergebnissen. Bei subkapsulär transplantierten Ratten stellte sich unmittelbar nach TX eine Normoglykämie ein (Abb. 1). Im Gegensatz dazu führte die intraportale Insel-TX, abgesehen von einer kurzzeitigen Absenkung, zu keiner Zeit zur Normalisierung der Stoffwechsellage.

Bezüglich der mittleren Transplantatfunktion (MTF) wurde bei subkapsulär transplantierten Tieren eine signifikant längere Funktionszeit als bei der diabetischen Kontrolle ( $p < 0.01$ , Mann-Whitney-Test) und intraportal transplantierten Tieren ( $p < 0.05$ ) gemessen (Tab. 4).

Im Bezug auf den mittleren Serumglukosespiegel (MSG) wurden bei subkapsulär transplantierten Ratten im Gegensatz zur diabetischen Kontrolle ( $p < 0.001$ , Mann-Whitney-Test) und intraportal transplantierten Gruppe ( $p < 0.01$ ) normoglykämische Werte gemessen (Tab. 4).

Tab. 4: Individuelle und mittlere Transplantatfunktion (MTF) und mittlere Serumglukose (MSG) nach TX von Schweineinseln in diabetische, athymische Ratten in Abhängigkeit vom TX-Ort.

<b>Gruppe</b>	<b>n</b>	<b>Individuelle TF (n x Tage)</b>	<b>MTF (Tage)</b>	<b>MSG (mg/dl)</b>
Diab. Kontrolle	8	8x0	0.1±0.1**	416.0±34.7***
Nierenkapsel	11	7x16, 4x0	12.1±2.1	162.0±22.8
Intraportal	8	1x1, 7x0	2.0±2.0*	346±36.7**

(\*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.01$ , \*\*\*= $p < 0.001$  vs. Nierenkapsel)

## 3.1.2 Nitrit/Nitrat-Bestimmung im Empfängerserum

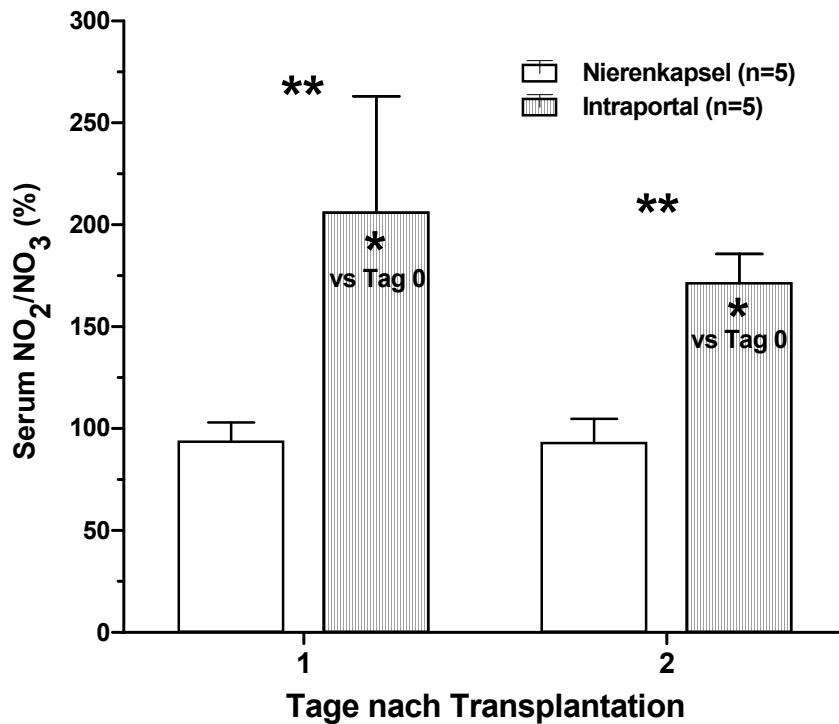


Abb. 2: Serum-Nitrit/Nitrat (%), bezogen auf Ausgangswerte vor TX, 24 h und 48 h nach TX von Schweineinseln in diabetische, athymische Ratten in Abhängigkeit vom TX-Ort (\*\*=p<0.01).

Der mit dem frühen Inseltransplantat-Versagen assoziierte Serum-Nitrit/Nitrat-Spiegel (Abb. 2) nahm bei intraportal transplantierten Ratten von  $42.7 \pm 10.0 \mu\text{M}$  auf  $73.3 \pm 11.3 \mu\text{M}$  24 h ( $p < 0.05$ , Wilcoxon-Test) und  $67.6 \pm 11.7 \mu\text{M}$  48 h ( $p < 0.05$ ) nach TX im Vergleich zu den initialen Werten am Tag 0 signifikant zu. Im Gegensatz dazu war der initiale Nitrit/Nitrat-Spiegel ( $32.2 \pm 2.5 \mu\text{M}$ ) in der subkapsulär transplantierten Gruppe 24 h ( $30.6 \pm 4.7 \mu\text{M}$ , ns vs. Tag 0) und 48 h ( $30.1 \pm 4.6 \mu\text{M}$ , ns vs. Tag 0) nach TX unverändert.

### 3.2 Antiinflammatorische Strategien nach intraportaler Inseltransplantation in athymische Ratten

#### 3.2.1 Behandlung mit selektiven und unselektiven iNOS-Inhibitoren

##### 3.2.1.1 Transplantatfunktion

4.000 frisch isolierte Schweineinseln wurden in diabetische, athymische Ratten intraportal transplantiert. Als Kontrolle dienten diabetische, scheintransplantierte Ratten. Dabei wurde die Effizienz von hochselektiven (SMT, AE-ITU) und unselektiven (L-NMMA) iNOS-Inhibitoren mit der vom Steroidhormon DXM hinsichtlich einer Verbesserung der Transplantatfunktion verglichen.

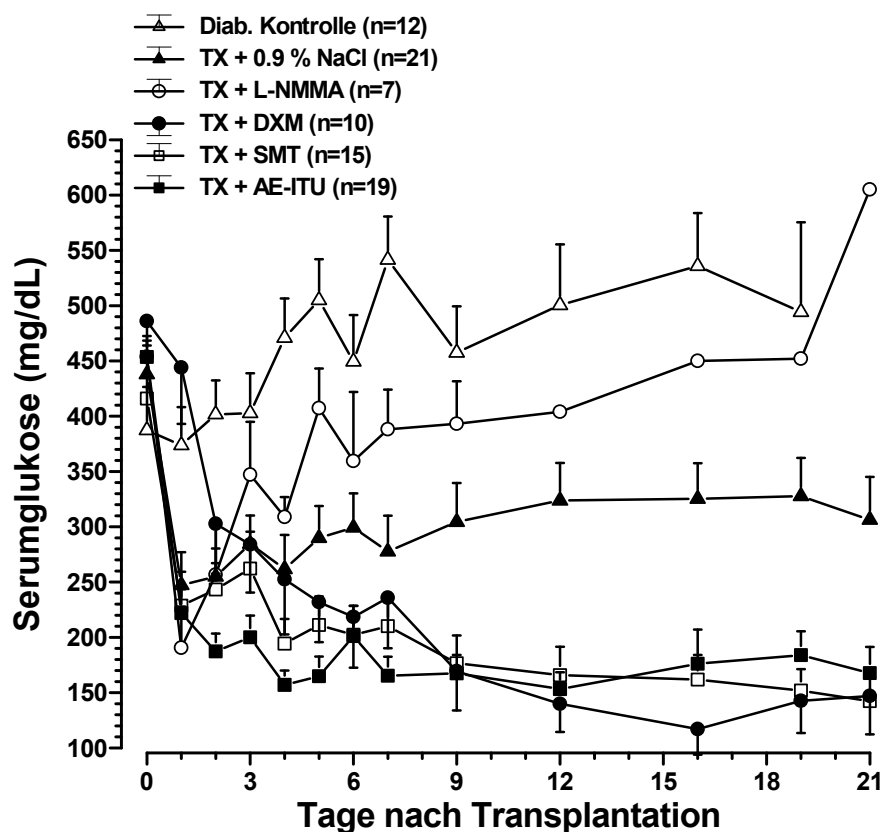


Abb. 3: Postprandiale Serumglukose nach Tx von Schweineinseln in diabetische, athymische Ratten in Abhängigkeit von applizierten iNOS-Inhibitoren.

Der Verlauf der Serumglukose zeigte, dass die mit SMT, AE-ITU und DXM behandelten Empfängern bereits zu Beginn des Beobachtungszeitraumes eine anhaltende Normoglykämie

aufwiesen. Die restlichen Gruppen blieben während des gesamten Beobachtungszeitraumes im hyperglykämischen Wertebereich (Abb. 3).

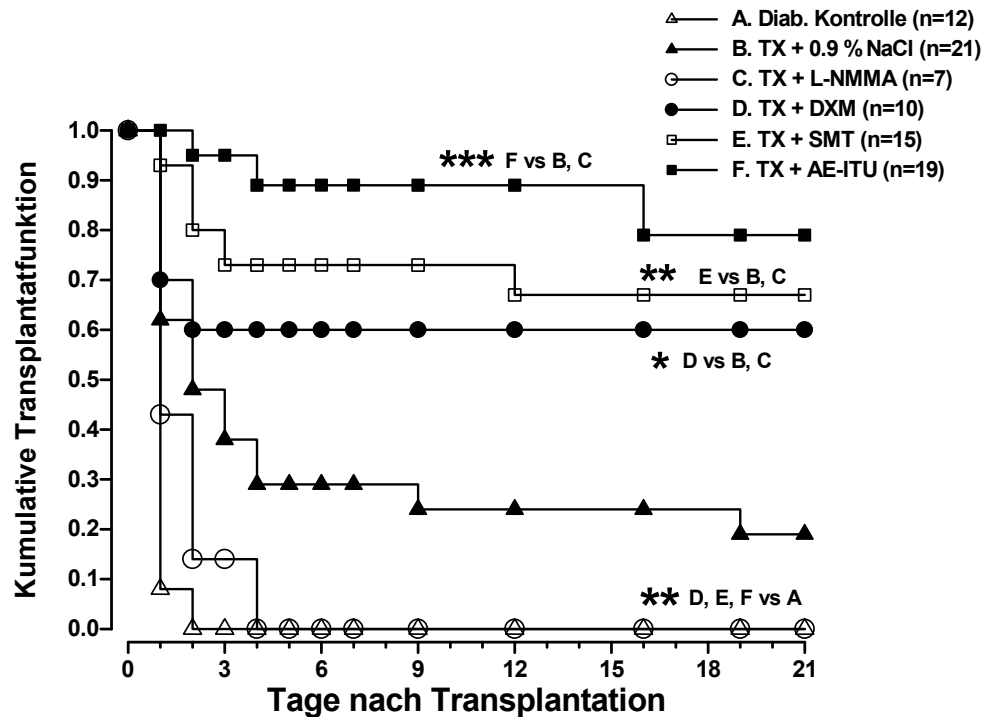


Abb. 4: Einfluss von applizierten iNOS-Inhibitoren auf die kumulative Transplantatfunktion von Schweineinseln in diabetischen, athymischen Ratten (\*= $p<0.05$ , \*\*= $p<0.01$ , \*\*\*= $p<0.001$ ).

Wie aus der Abb. 4 zu ersehen ist, zeigten nur 19 % intraportal transplantierten und unbehandelten Ratten eine Transplantatfunktion während der gesamten Beobachtungsperiode. L-NMMA-Empfänger zeigten eine Transplantatfunktion, die sich nicht von der Funktion der diabetischen Kontrolle unterschied. Im Gegensatz zu diesen beiden Gruppen wurde eine signifikant höhere Transplantatfunktionsrate bei DXM- (60 %,  $p<0.05$  vs. unbehandelt und L-NMMA-Empfängern, Fischers Exakttest), SMT-(67 %,  $p<0.01$ ) und AE-ITU-Empfängern (79 %,  $p<0.001$ ) beobachtet, die zur Normalisierung der Serumglukose führte.

Kein signifikanter Unterschied besteht hinsichtlich der mittleren Transplantatfunktion (MTF) bei DXM-Empfängern im Vergleich zur unbehandelten Gruppe (NaCl) und L-NMMA-Empfängern (Tab. 5). Dagegen ist die mittlere Transplantatfunktion bei SMT- ( $p<0.01$ , Mann-Whitney-Test) und AE-ITU-Empfängern ( $p<0.001$ ) signifikant höher als bei unbehandelten Empfängern (NaCl) und L-NMMA-Empfängern.

Tab. 5: Einfluss von applizierten iNOS-Inhibitoren auf die individuelle und mittlere Transplantatfunktion (MTF) und mittlere Serumglukose (MSG) und die Wiederfindung von endogenem Insulin nach TX von Schweineinseln in diabetische, athymische Ratten.

Gruppe	n	Individuelle TF (n x Tage)	MTF (Tage)	MSG (mg/dl)	Insulinwiederfindung (%) im Empfängerpankreas
Diab. Kontrolle	12	1x1, 11x0	0.1±0,1	452±30.5	2.3±6.0§§, ¶¶¶
TX+0.9% NaCl	21	4x21, 1x17, 1x7, 2x3, 2x2, 3x1, 8x0	5.8±1.9†	299±26.1‡	6.2±1.3§§§, ¶
TX+L-NMMA	7	1x3, 2x1, 4x0	0.7±0.4	340±18.8†	1.7±0.4§, ¶
TX+DXM	10	6x21, 1x1, 3x0	12.7±3.4†	191±26.5‡, **	9.8±4.7§
TX+SMT	15	10x21, 1x9, 1x2, 2x1, 1x0	14.9±2.4‡, **	171±18.0‡, ***	15.5±1.8
TX+AE-ITU	19	15x21, 2x13, 1x3, 1x1	18.2±1.4‡, ***	177±15.9‡, ***	8.8±1.0§§

(†=p<0.01, ‡=p<0.001 vs. Diabetische Kontrolle; \*\*=p<0.01, \*\*\*=p<0.001 vs. Unbehandelt (0.9% NaCl) und L-NMMA; §=p<0.05, §§=p<0.01, §§§=p<0.001 vs. SMT; ¶=p<0.05, ¶¶¶=p<0.001 vs. AE-ITU)

Die Berechnung der mittleren Serumglukose (MSG) nach Ablauf der Beobachtungsperiode zeigte, dass Empfänger, die mit DXM (p<0.01, Mann-Whitney-Test) SMT und AE-ITU (p<0.001) behandelt wurden, eine konstante Normoglykämie aufwiesen. Verglichen mit der diabetischen Kontrollgruppe wurde ein signifikant niedrigerer Wert für die mittlere Serumglukose bei der unbehandelten Gruppe (p<0.001) sowie L-NMMA-Empfängern (p<0.01) beobachtet.

### 3.2.1.2 Bestimmung des endogenen Insulins im Empfängerpankreas

Um zu prüfen, inwieweit die residualen  $\beta$ -Zellfunktion der endogenen Ratteninseln nach TX und Behandlung zur Normalisierung von Serumglukose beitrug, wurde am Ende der Beobachtungsperiode der pankreatische Insulingehalt bestimmt.

Der endogene Insulingehalt (Tab. 5) war im Vergleich zur Normalkontrolle (n=8) von 1.77±0.09 U/g auf 0.04±0.01 U/g (2.3±0.6 %) und 0.03±0.01 U/g (1.7±0.4 %) bei der diabetischen Kontrolle (n=3) bzw. L-NMMA-Empfängern (n=3) stark gesunken. Verglichen mit diesen beiden Gruppen war der endogene Insulingehalt bei SMT- (p<0.01 vs. diabetische Kontrolle, p<0.05 vs. L-NMMA-Empfänger, Mann-Whitney-Test) und AE-ITU-Empfängern (p<0.001 vs. diabetische Kontrolle, p<0.05 vs. L-NMMA-Empfänger) signifikant höher.

## 3.2.1.3 Nitrit/Nitrat-Bestimmung im Empfängerserum

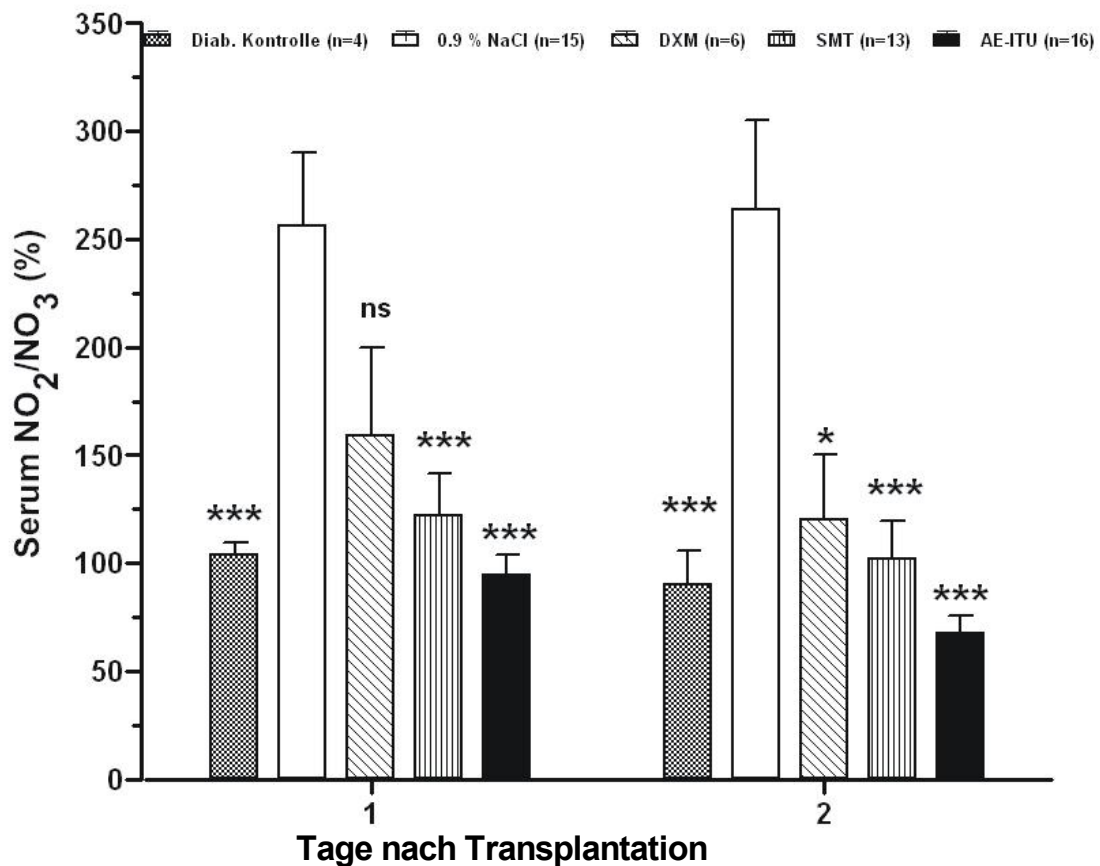


Abb. 5: Serum-Nitrit/Nitrat (%), bezogen auf Ausgangswerte vor TX, 24 h und 48 h nach TX von Schweineinseln in diabetische, athymische Ratten in Abhängigkeit von applizierten iNOS-Inhibitoren (\*= $p < 0.05$ , \*\*\*= $p < 0.001$  und ns= $p > 0.05$  vs. 0,9 % NaCl).

Der initiale Serum-Nitrit/Nitrat-Spiegel von unbehandelten Ratten ( $30.2 \pm 5.2 \mu\text{M}$ ) war 24 h und 48 h nach TX nahezu verdreifacht ( $p < 0.01$ , vs. vor TX, Wilcoxon-Test) und signifikant höher im Vergleich zu den restlichen Versuchsgruppen ( $p < 0.05$  vs. DXM-Empfänger,  $p < 0.001$  vs. Diabetische Kontrolle, SMT- und AE-ITU-Empfänger). Kein signifikanter Unterschied der initialen NO-Synthese wurde in DXM-, SMT- und AE-ITU-Empfängern gemessen. Verglichen mit Tag 0 wurde jedoch 48 h nach Transplantation eine geringfügige Absenkung des initialen Serum-Nitrit/Nitrat-Spiegels in den SMT- ( $24.5 \pm 2.6$  vs.  $29.8 \pm 3.5 \mu\text{M}$ , ns) und AE-ITU-Empfängern ( $26.9 \pm 2.8$  vs.  $41.9 \pm 2.7 \mu\text{M}$ ,  $p < 0.01$ ) festgestellt. Auf Grund schwerer Dehydratation und schlechter körperlicher Verfassung konnten neben den routinemäßigen Proben für Serumglukose keine repräsentative Proben für die NO-Bestimmung in L-NMMA-Empfängern entnommen werden.

### 3.2.2 Behandlung mit Nikotinamid

#### 3.2.2.1 Transplantatfunktion

Diabetische, athymische Empfängertiere wurden nach intraportaler TX von 4.000 frisch isolierten Schweineinseln bzw. nach Scheintransplantation jeweils mit unterschiedlichen Dosierungen von NA behandelt. Als Kontrolle dienten diabetische, scheintransplantierte Tiere.

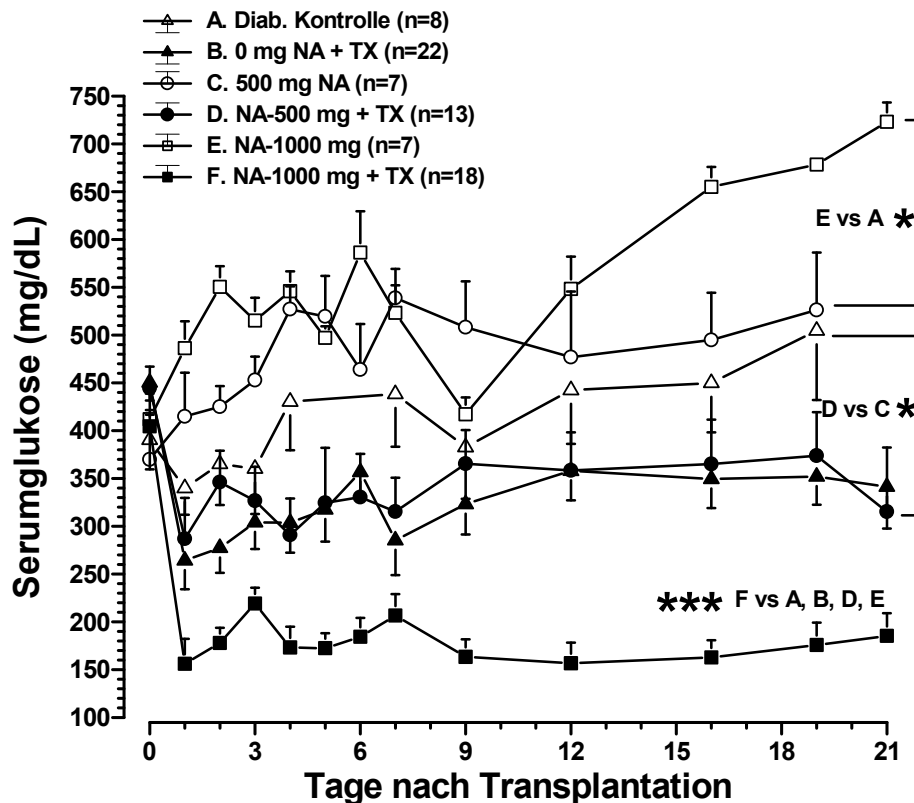


Abb. 6: Postprandiale Serumglukose nach intraportaler TX von Schweineinseln in diabetische, athymische Ratten in Abhängigkeit von der NA-Dosis (\*= $p < 0.05$ , \*\*\*= $p < 0.001$ ).

Transplantatempfänger, die mit 1.000 mg NA behandelt wurden, zeigten im Vergleich zu den restlichen Gruppen eine signifikante Normalisierung der Serumglukose ( $p < 0.001$ , Mann-Whitney-Test). Scheintransplantierte Tiere, die mit 1.000 mg NA behandelt wurden, wiesen eine signifikant höhere Serumglukose als diabetische Kontrolltiere auf ( $p < 0.05$ ). Die Behandlung mit 500 mg NA führte bei transplantierten Tieren zu keiner Normoglykämie (Abb. 6 und Tab. 6).



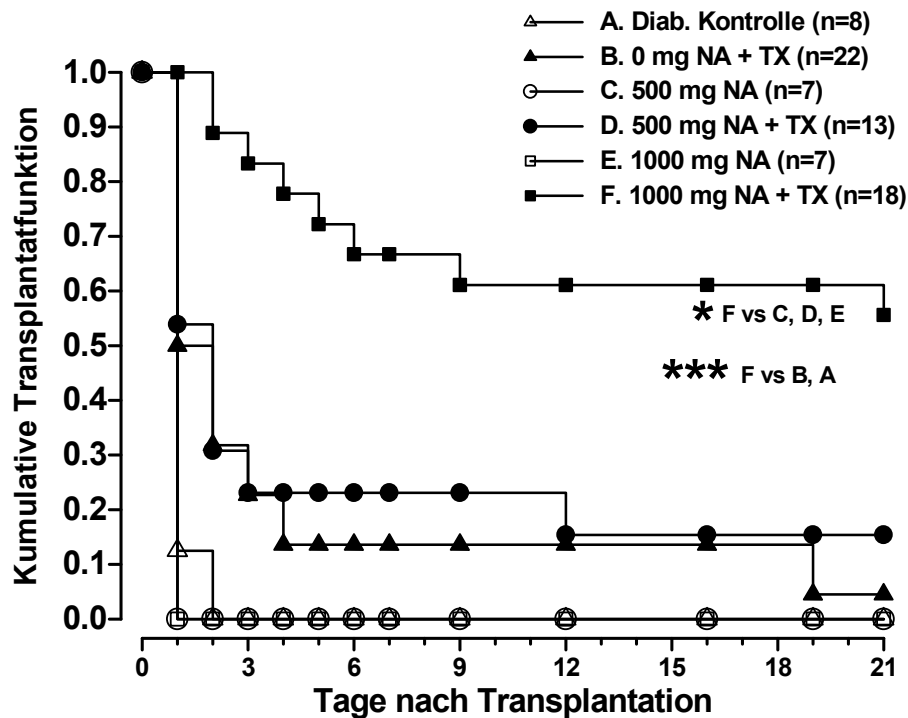


Abb. 7: Kumulative Transplantatfunktion von Schweineinseln in diabetischen, athymischen Ratten in Abhängigkeit von der applizierten NA-Dosis (\*= $p < 0.05$ , \*\*\*= $p < 0.001$ ).

Wie aus der Abb. 7 und Tab. 6 zu ersehen ist, zeigten nur 4.5 % von intraportal transplantierten, unbehandelten Tieren eine Transplantatfunktion von 21 Tagen und 9 % von Tieren eine Funktion über 16 Tagen (ns vs. diab. Kontrolle, Fischers Exakttest). Die Behandlung mit 500 mg NA führte zu einer geringen Transplantatfunktion (15.5 %, ns vs. 0 mg NA). Im Gegensatz dazu, kam es bei 56 % von Tieren, die mit 1.000 mg NA behandelt wurden, zu einer Normoglykämie innerhalb der gesamten Beobachtungsperiode ( $p < 0.001$  vs. 0 mg NA und  $p < 0.05$  vs. 500 mg NA).

Die Analyse der mittleren Transplantatfunktion (MTF, Tab. 6) zeigte eine signifikant hohe Funktionsrate bei mit 1.000 mg NA behandelten Inselempfängern ( $p < 0.001$ , vs. 0 mg NA+TX und 500 mg NA+TX, Mann-Whitney-Test). Nur die mit 1.000 mg NA behandelten Inselempfängern zeigten eine permanente Normoglykämie mit einer mittleren Serumglukose (MSG), die über die gesamte Beobachtungsperiode im normoglykämischen Bereich lag ( $p < 0.001$  vs. 0 mg NA und 500 mg NA, Mann-Whitney-Test). Im Vergleich zu den korrespondierenden, scheintransplantierten Kontrollgruppen zeigten Transplantatempfänger eine signifikante Absenkung der mittleren Serumglukose (MSG) ( $p < 0.05$  vs. 0 mg,  $p < 0.01$  vs. 500 mg und  $p < 0.001$  vs. 1.000 mg NA).

Tab. 6: Individuelle und mittlere Transplantatfunktion (MTF) und mittlere Serumglukose (MSG) nach TX von Schweineinseln in diabetische, athymische Ratten in Abhängigkeit von der NA-Dosis.

Gruppe	n	Individuelle TF (n x Tage)	MTF (Tage)	MSG (mg/dl)
Diab. Kontrolle	8	1x1, 7x0	0.1±0.1	416±34.7
0 mg NA+TX	22	1x21, 2x16, 2x3, 2x2, 4x1, 11x0	3.1±1.3*	328±23.2*
500 mg NA	7	7x0	0.0±0.0	480±34.0
500 mg NA+TX	13	2x21, 1x9, 1x2, 3x1, 6x0	4.0±2.2*	346±34.1**
1.000 mg NA	7	7x0	0.0±0.0	531±8.3¶
1.000 mg NA+TX	18	10x21, 1x16, 1x7, 1x5, 1x4, 1x3, 1x2, 2x1	14.1±2.1†, ***	183±15.7†, ***

(\*= $p<0.05$ , \*\*= $p<0.01$ , \*\*\*= $p<0.001$  vs. korrespondierende, scheintransplantierte Kontrollgruppen; †= $p<0.001$  vs. 0 mg NA+TX und 500 mg NA+TX, ¶= $p<0.05$  vs. diab. Kontrolle)

### 3.2.2.2 Nitrit/Nitrat-Bestimmung im Empfängerserum

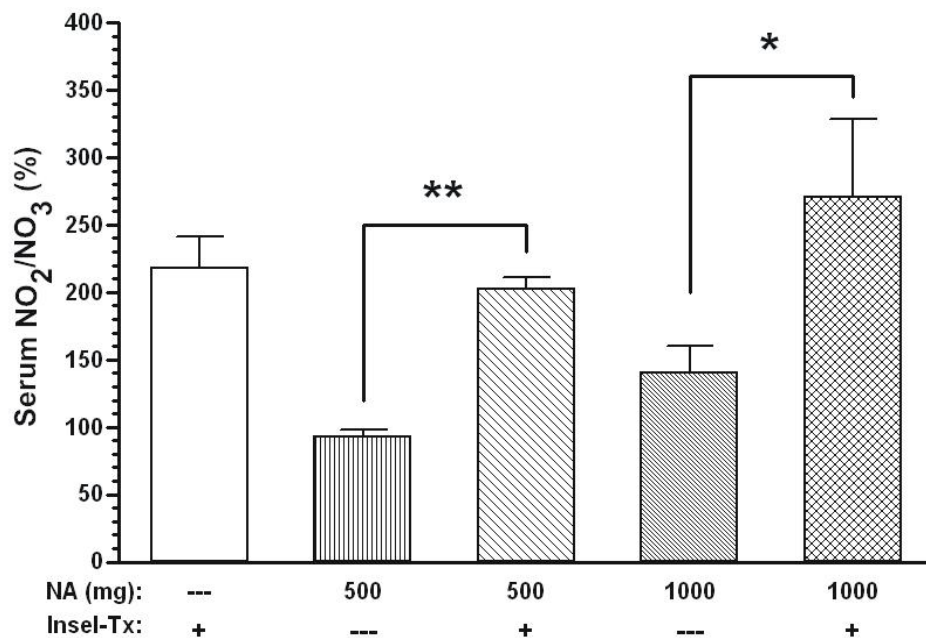


Abb. 8: Serum-Nitrit/Nitrat (%) bezogen auf Ausgangswerte vor TX und 48 h nach TX von Schweineinseln in diabetische, athymische Ratten in Abhängigkeit von der NA-Dosis (\*= $p<0.05$ , \*\*= $p<0.01$ ).

Bezüglich des initialen Serum-Nitrit/Nitrat-Spiegels wurde bei allen Inselempfängern 48 h nach TX (Abb. 8) eine signifikante Verdoppelung im Vergleich zu den korrespondierenden, scheintransplantierten Kontrollgruppen beobachtet ( $p < 0.01$  500 mg NA vs. Kontrolle,  $p < 0.05$  1.000 mg NA vs. Kontrolle, Mann-Whitney-Test).

### 3.2.2.3 Bestimmung von endogenem Insulin im Empfängerpankreas

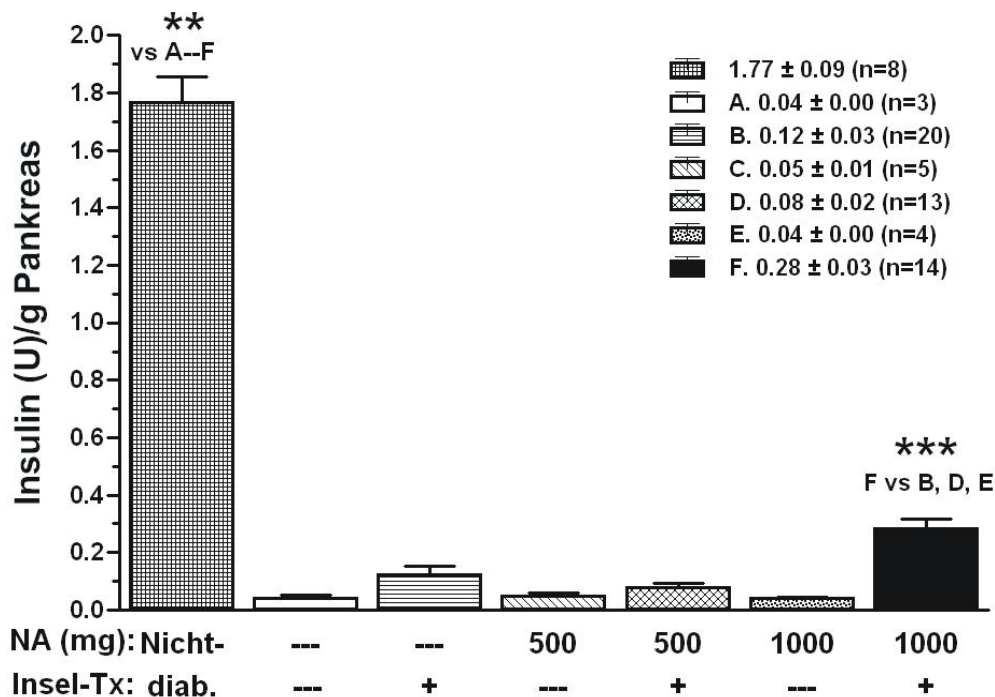


Abb. 9: Wiederfindung von endogenem Insulin (%) nach TX von Schweineinseln in diabetische, athymische Ratten in Abhängigkeit von der NA-Dosis (\*\*= $p < 0.01$ , \*\*\*= $p < 0.001$ ).

Die Bestimmung des pankreatischen Insulingehalts am Ende der Versuchsperiode dient dazu, die Wirksamkeit von NA auf die Regeneration der residualen Ratteninseln zu untersuchen.

Wie in der Abb. 9 dargestellt, bewirkte die STZ-Applikation eine drastische Absenkung des endogenen Insulingehalts in allen Versuchsgruppen. Verglichen mit den korrespondierenden, scheintransplantierten Kontrollgruppen konnte eine geringfügige Zunahme des endogenen Insulingehalts bei allen Inselempfängern gemessen werden, die jedoch nur bei Inselempfängern, die mit 1.000 mg NA behandelt wurden, signifikant höher war ( $p < 0.001$ , Mann-Whitney-Test).

### 3.2.3 Einfluss von Hitzeschockproteinen auf die inflammatorische Resistenz isolierter Schweineinseln

#### 3.2.3.1 Induktion von HSP-70

##### 3.2.3.1.1 Expositionsdauer

Eine signifikante Zunahme der basalen HSP-70-Expression wurde bereits nach 30 Min. Hitzeexposition gemessen ( $p < 0.05$ , Wilcoxon-Test). Die kontinuierliche Steigerung hielt bis zur 90 Min. nach Beginn der Hitzeexposition an. Eine Hitzebehandlung über 90 Min. hinaus bewirkte keine weitere Steigerung der HSP-70-Expression (Abb. 10).

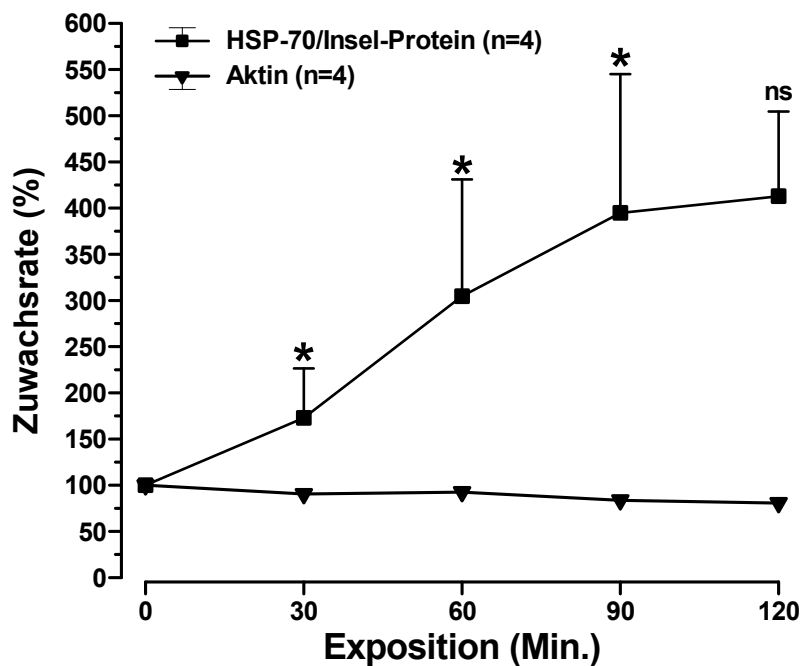


Abb. 10: Einfluss der Expositionsdauer auf die Expression (%) von HSP-70 in frisch isolierten, hitzeexponierten (43°C) Schweineinseln (\*= $p < 0.05$ , ns= $p > 0.05$ ).

##### 3.2.3.1.2 Regenerationsdauer

Die maximale Antwort der HSP-Expression auf eine konstante Hitzebehandlung (90 Min.) wurde nach 4 h Regeneration bei 37°C gemessen und blieb bis zu 48 h konstant (Abb. 11).

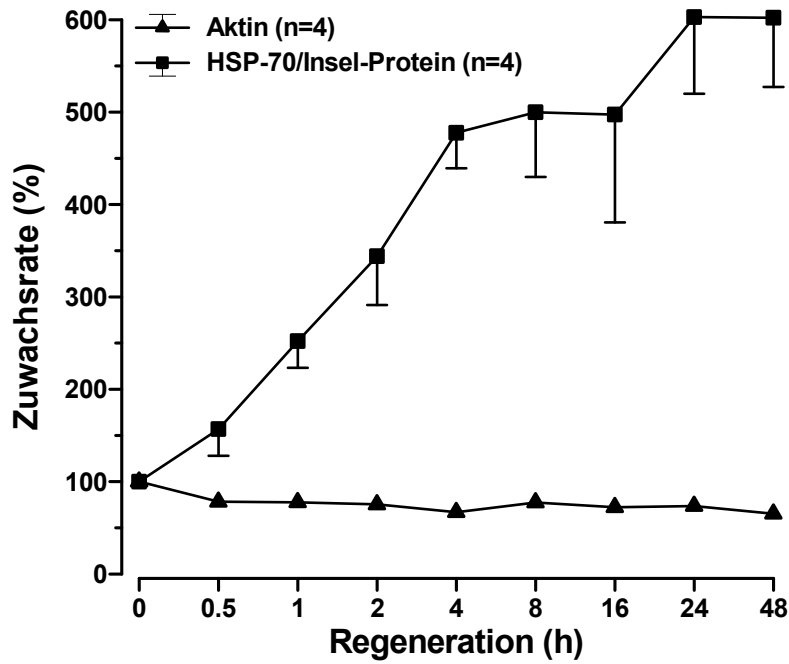


Abb. 11: Einfluss der Regenerationsdauer auf die Expression (%) von HSP-70 in frisch isolierten, hitzeexponierten (43°C/90 Min.) Schweineinseln.

### 3.2.3.2 Qualitätskontrollen

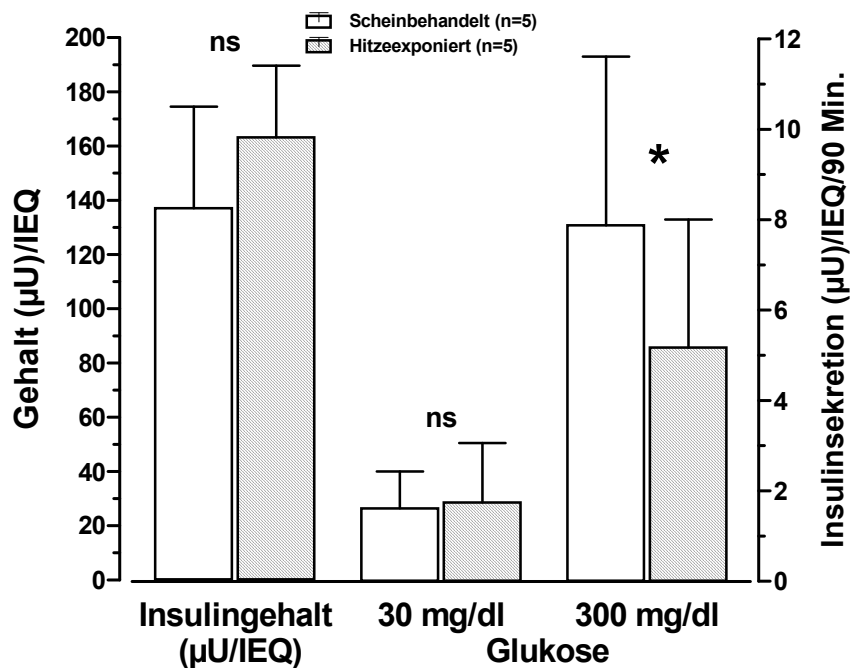


Abb. 12: Insulingehalt und glukosestimulierte Insulinsekretion (µU/IEQ/90Min.) von scheinbehandelten und hitzeexponierten Schweineinseln nach 24 h Kultivierung bei 37°C (\*= $p < 0.05$ , ns= $p > 0.05$ ).

Die Qualitätskontrolle der hitzeexponierten Inseln mittels Trypanblau-Exklusion (Viabilität) war im Vergleich zur Kontrolle nicht beeinträchtigt (ohne Abbildung,  $94 \pm 2.4\%$  vs.  $88 \pm 4.6\%$ , ns, Wilcoxon-Test). Der Insulingehalt der hitzeexponierten Inseln nahm im Vergleich zur Kontrolle leicht zu. Im Gegensatz zur Viabilität war die Insulinsekretion der hitzeexponierten Inseln nach der Glukosestimulation im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert (Abb. 12). Dennoch war der Stimulationsindex, das Verhältnis der stimulierten zur basalen Insulinsekretion, zwischen scheinbehandelten und hitzeexponierten Inseln nicht signifikant unterschiedlich ( $9.3 \pm 3.7$  vs.  $7.6 \pm 3.3$ , ns).

### 3.2.3.3 Inkubation mit Natrium-Nitroprusside oder Wasserstoffperoxid

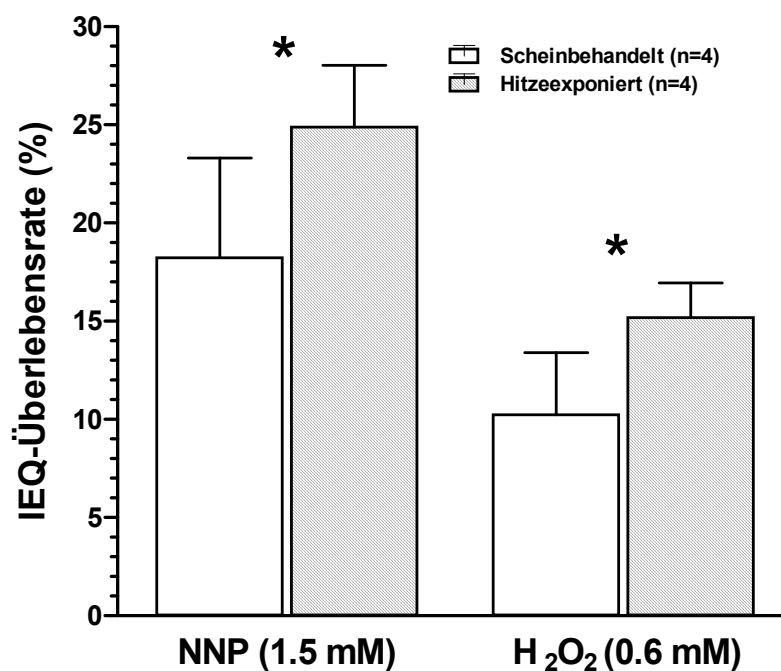


Abb. 13: Überlebensrate (%) von scheinbehandelten und hitzeexponierten Schweineinseln nach 20 h Inkubation mit NNP oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (\*= $p < 0.05$ ).

Die Überlebensrate der hitzeexponierten Inseln (5.000-10.000 IEQ) nach Behandlung mit 1.5 mM Natrium-Nitroprusside (NNP) oder 0.6 mM Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) war gegenüber Kontrollinseln (scheinbehandelt) signifikant höher (Abb. 13).

Bezüglich der Inselviabilität nach Behandlung mit NNP oder  $H_2O_2$  wurden zwei unterschiedliche Beobachtungen gemacht. Zum einen waren kleine Inseln vollständig nach Behandlung durch NNP oder  $H_2O_2$  zerfallen. Zum anderen blieben die morphologisch intakten Inseln hochviabel. Daher blieb die Inselviabilität nach NNP- oder  $H_2O_2$ -Behandlung nahezu vollständig erhalten. Verglichen mit der Kontrolle wurde bei hitzeexponierten Inseln eine signifikant höhere Viabilität nur nach Inkubation mit  $H_2O_2$  beobachtet (Abb. 14).

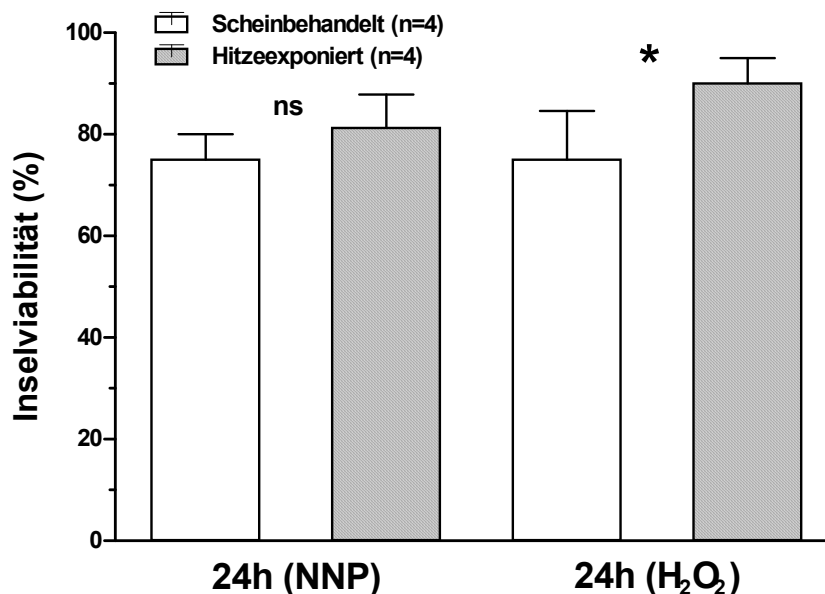


Abb. 14: Inselviabilität von scheinbehandelten und hitzeexponierten Schweineinseln nach 20 h Inkubation mit NNP oder  $H_2O_2$  (\*= $p < 0.05$ , ns =  $p > 0.05$ ).

#### 3.2.3.4 Insulinwiederfindung nach Transplantation von scheinbehandelten bzw. hitzeexponierten Schweineinseln unter die Nierenkapsel nicht-diabetischer, euthymischer Ratten

Zwei Tage nach TX war die Wiederfindung des initial transplantierten Insulingehaltes bei scheinbehandelten Inseln signifikant höher ( $p < 0.05$ , Wilcoxon-Test) als bei hitzeexponierten Inseln (Abb. 15).

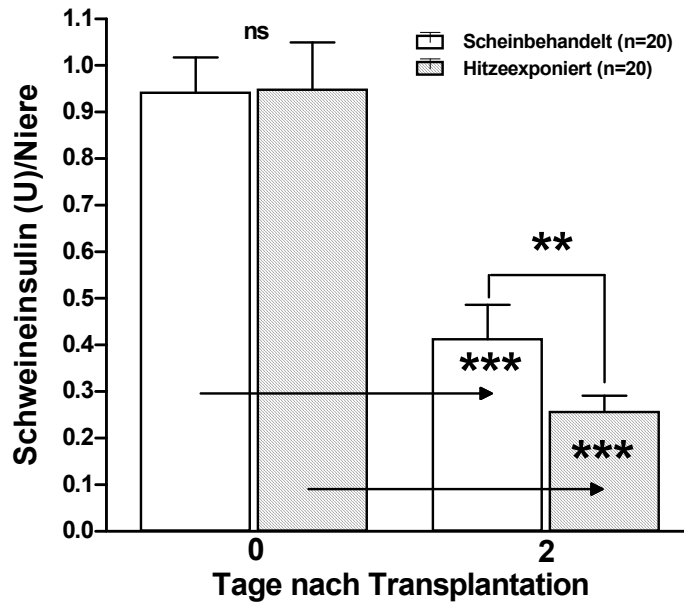


Abb. 15: Wiederfindung von Schweineinsulin (U/Niere) nach Insel-TX unter die Nierenkapsel von euthymischen, nicht-diabetischen Ratten (\*\*= $p<0.01$ , \*\*\*= $p<0.001$ , ns = $p>0.05$ ).

Im Gegensatz dazu war die Insulinwiederfindung nach zeitlich parallel verlaufender Inselkultivierung ( $37^{\circ}\text{C}$ ) nach Hitzeexposition signifikant höher ( $p<0.01$ , Wilcoxon-Test) als nach Scheinbehandlung (Abb. 16).

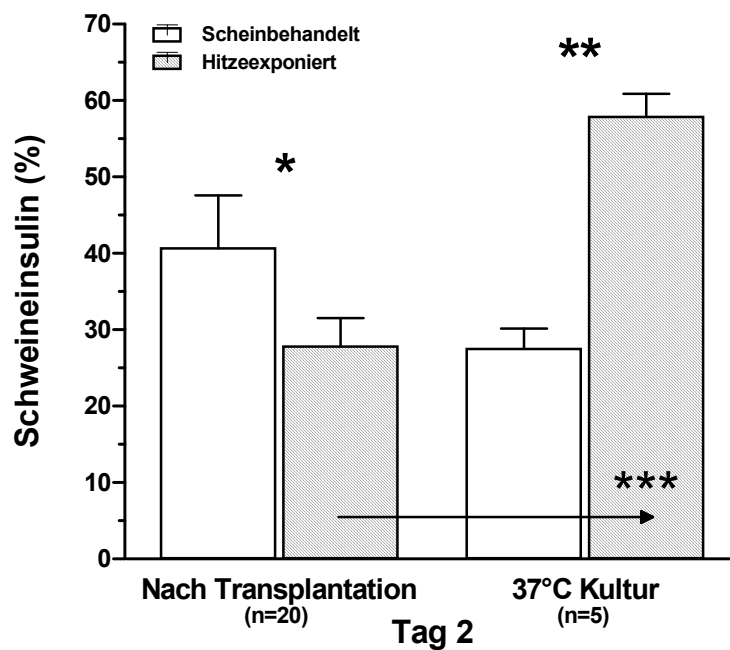


Abb. 16: Wiederfindung von Schweineinsulin (%) 48 h nach Insel-TX unter die Nierenkapsel euthymischer, nicht-diabetischer Ratten bzw. gleichzeitiger Inselkultivierung bei  $37^{\circ}\text{C}$  (\*= $p<0.05$ , \*\*= $p<0.01$ , \*\*\*= $p<0.001$ ).



## 4. DISKUSSION

Die Prävention oder zumindest die Verzögerung der Entwicklung diabetes-spezifischer Sekundärkomplikationen bei Typ-I-Diabetikern ist das Hauptziel der klinischen Insel-TX. Die ersten erfolgreichen TX isolierter Langerhansscher Inseln bei diabetischen Ratten wurden vor über 30 Jahren [3] durchgeführt. Seither wurden in weiteren Tierexperimenten an Nagern und größeren Säugetieren beachtliche Fortschritte erzielt [2, 147]. In weiteren experimentellen und klinischen Insel-TX konnten durch dieses Therapieverfahren nicht nur die Sekundärkomplikationen verhindert, sondern auch die bereits bestehenden Organschäden zum Teil noch zurückgebildet werden [39].

Die im Vergleich zur Pankreas-TX niedrigeren Erfolgsraten [18] konnten durch ein kortikoidfreies Immunsuppressionsprotokoll und die Implantation von mindestens 10.000 IEQ/kg/KG auf ein völlig neues Niveau gehoben werden [128]. Allerdings wird dadurch das Missverhältnis zwischen brauchbaren und angebotenen Spenderorganen und der Zahl potentieller Empfänger weiter verstärkt.

Die Gründe für den enorm hohen Bedarf an Inseln, die zum Erreichen einer langfristigen Insulinfreiheit benötigt werden, sind noch nicht vollständig geklärt, aber Befunde aus neueren Experimenten lassen diese mutmaßlichen Effekte vermuten:

### 1. Apoptose

Apoptose oder programmierter Zelltod ist im Gegensatz zur Nekrose ein gezielter Untergang bestimmter unerwünschter oder geschädigter Zellen und zusammen mit der Proliferation ein normaler physiologischer Vorgang zur Konstanthaltung der Zellzahl [117]. Ein großer Anteil der Inseln, die durch das enzymatische Isolierungsverfahren aus ihrer pankreatischen extrazellulären Matrix herausgerissen wurden, sterben an Apoptose [107].

### 2. Instant Blood-Mediated Inflammatory Reaction (IBMIR)

Durch die Infusion der Inseln in die Portalvene des Empfängers kommt es durch den Kontakt der Inseln mit dem Spenderblut zur Koagulation des Transplantats und zur Induktion der

Komplementkaskade, welche zum Untergang einer erheblichen Anzahl transplantierte Inseln führt [10].

### 3. Implantation der Inseln in ein proinflammatorisches Organ

Der chronische eklatante Mangel an humanen Spenderorganen und die rückläufige Spenderbereitschaft erfordert es, in der gegenwärtigen Situation nach alternativen Spender-Spezies zu suchen. Dies wird von erheblicher Bedeutung sein, wenn die Insel-TX auf einen größeren Patientenkreis von Typ-I-Diabetikern noch vor Auftreten diabetes-spezifischer Sekundärkomplikationen angewendet werden soll.

In der vorliegenden Studie wurde das Schwein aufgrund seines Potentials als zukünftiger Organspender für die klinische Xeno-TX ausgewählt. Entsprechend der klinisch angewendeten Standardtechnik wurden die isolierten Inseln intraportal in diabetische, athymische (T-Zelldefiziente) Nacktratten implantiert. Dieses Empfängermodell ermöglicht eine längerfristige Beobachtung der Inseltransplantatfunktion in einem inflammatorischen Milieu ohne durch reaktive T-Lymphozyten [50] beeinflusst zu werden. Zur Vermeidung bzw. zur Dosisverringern inseltoxischer Immunsuppressiva untersuchten wir die Wirksamkeit von Substanzen und Maßnahmen zum Schutz des Transplantates gegenüber unspezifischen, inflammatorischen Reaktionen des Inselempfängers.

#### 4.1 Vergleich der subkapsulären und intraportalen Transplantation

Unter den für das Transplantatversagen verantwortlichen Faktoren ist der Implantationsort von entscheidender Bedeutung [54, 60, 61]. Die am meisten und umfassend untersuchten Implantationsorte sind Leber und Niere. Beide Organe sind gut vaskularisiert und ermöglichen eine ausreichende Nährstoffversorgung des Transplantat [68, 113].

Obwohl die meisten experimentellen Vergleiche zwischen TX unter die Nierenkapsel und Implantation in die Leber zeigen, dass die Leber im Vergleich zur Niere ein proinflammatorisches Mikromilieu aufweist (NO durch Hepatozyten, IBMIR etc.), scheiterten erste klinische Versuche bei Typ-I-Diabetikern, eine Reduzierung des Insulinbedarfs durch TX von Inseln unter die Nierenkapsel zu erreichen [62].

Zum einen ist der Raum, um eine Inselpräparation unter die Nierenkapsel zu implantieren, sehr begrenzt und stellt hohe Anforderungen an die Reinheit der Präparation [43, 45]. Zum anderen besitzt die Leber im Vergleich zu anderen Geweben die besten physiologischen Voraussetzungen für die Freisetzung und Wirkung von Insulin und hat sich daher als das Standartorgan für eine Insel-TX etabliert [18].

Unsere eigenen Befunde im Modell der diabetischen Nacktratten zeigen eindeutig, dass auch ohne Beteiligung funktionaler T-Lymphozyten eine Zerstörung oder zumindest eine Hemmung von Schweineinseln nach intraportaler TX beobachtet wird. Im Gegensatz dazu war eine permanente Inselfunktion nach Implantation unter die Nierenkapsel zu verzeichnen. Diese Befunde stimmen mit Beobachtungen an isolierten Hundeinseln [35] und fetalen Schweineinseln [73] überein.

Befunde der in-vitro-Experimente [103, 104], aber auch Beobachtungen nach klinischer Auto-TX [135], zeigen, dass sezerniertes NO einen signifikanten Effektor der Inselfunktion nach intraportaler TX darstellt.

Die exakte Induktionskaskade zur NO-Synthese ist noch nicht vollständig geklärt. Aber die erhöhte IL-1- $\beta$  mRNA-Expression im Blut immunsupprimierter, inseltransplanterter Patienten lässt trotz vollständiger Elimination von Mononukleazellen vermuten, dass auch Zytokine an der Sekretion von NO beteiligt sind [38].

## **4.2 Hemmung der iNOS**

In älteren Studien wurde die NO-Synthese nach intraportaler Insel-TX in Ratten und Mäusen sowohl in syngenem, als auch in xenogenen Kombinationen mittels L-NMMA wirksam blockiert [134, 6]. Die in anderen Studien beschriebenen Nebenwirkungen, wie Hypertonie und andere negative hämodynamische Wirkungen [76, 99, 121] oder eine direkte hämatotoxische Wirkung von L-NMMA [110], könnten neben der starken Dehydratisierung der Tiere, für die extrem schlechte Verfassung unserer mit L-NMMA behandelten Empfängern verantwortlich sein.

Die Behandlung mit SMT oder AE-ITU zeigte im Gegensatz zu L-NMMA eine gute Verträglichkeit und keine offensichtlichen Nebenwirkungen, die bei der Behandlung mit Aminoguanidin, einem anderen selektiven iNOS-Inhibitor, beobachtet wurden [55, 106, 138]. Die ermittelten Transplantatfunktionsraten bei SMT- und AE-ITU-Empfängern korrelierten mit einer kompletten Hemmung der intrahepatischen NO-Produktion während der gesamten Beobachtungsperiode.

Die NO-Synthese in den ersten 48 h nach TX war im Vergleich zu DXM-Empfängern bei SMT- und AE-ITU-Empfängern signifikant wirksamer blockiert. DXM beeinflusst vor allem die Signaltransduktion der iNOS-Expression und die TNF- $\alpha$  stimulierten Prostaglandinsynthese [75, 91]. Ein weiterer Effekt von DXM, nämlich die Hemmung der Zytokinsekretion der stimulierten Makrophagen [33], konnte für die kompetitive iNOS-Inhibitoren nicht nachgewiesen werden [96, 118].

Die verbesserte Transplantatfunktion in DXM-, SMT- und AE-ITU-Empfängern war mit einem geringen, aber signifikanten Anstieg des endogenen, pankreatischen Insulingehalts verbunden. Der ermittelte endogene Insulingehalt im Pankreas transplantierte, unbehandelter Ratten lässt vermuten, dass die Regeneration der Empfängerinseln einen sekundären Effekt der transplantatinduzierten Normoglykämie darstellt [5, 48].

Es konnte somit in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass die hochselektiven Isothioureat-Verbindungen die Induktion von NO-Synthese nach intraportaler Insel-TX ohne erkennbare Nebenwirkungen komplett hemmen können.

#### **4.3 Nikotinamid**

Der protektive Effekt von NA auf Inseln gegenüber inflammatorischen Attacken wurde in zahlreichen in-vitro-Experimenten nachgewiesen, die alle fast ausschließlich mit Nagern durchgeführt wurden [89]. In einem inflammatorischen Milieu beruht dieser Effekt in erster Linie auf Prävention einer letalen intrazellulären Energiedepletion, hervorgerufen durch den Verbrauch von NAD durch das DNA-Reparaturenzym Poly(ADP-Ribose)Polymerase (PARP), welches durch NA signifikant gehemmt wird. Die Aktivierung von PARP wird in erster Linie durch eine Schädigung der DNA-Stränge induziert, welche durch

inflammatorische Effektor-Moleküle wie  $O_2$ -Radikale oder toxische NO-Verbindungen hervorgerufen werden. Diskutiert wird auch eine erhöhte NAD-Produktion aus NA [51, 63, 125, 154, 158].

Aus den Experimenten mit Ratten- und Mausinseln geht hervor, dass diese gegenüber inflammatorischen Mediatoren signifikant empfindlicher reagieren als Human- oder Schweineinseln [9, 12, 145, 150]. Bisher konnte allerdings nicht nachgewiesen werden, ob die in-vitro-Experimente an Großtierinseln eine Relevanz für die Funktion der Inseln nach TX haben würden [34, 37, 56, 111].

Unsere Studie verdeutlicht, dass hochdosiertes NA ein frühes Inseltransplantat-Versagen im vorliegenden „Schwein-auf-Nacktratte-Modell“, das durch eine signifikante Beteiligung von NO charakterisiert ist, wirksam verringert. Die Beobachtung früherer Studien, dass NA die NO-Synthese durch iNOS verhindert [1, 28, 49], konnte in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden. Es wurde sogar eine vorübergehende Zunahme von NO-Bildung bei scheintransplantierten und transplantierten Ratten, die mit hochdosiertem NA behandelt wurden, beobachtet.

Im Gegensatz zu Versuchsergebnissen aus isologen Insel-TX in Nagetieren [70, 98, 144] war eine Therapie mit 500 mg NA/kg/Tag bei murinen allogenen Insel-TX [94, 102] unwirksam.

Gründe für diese Beobachtungen könnten möglicherweise auf die Spezifität, Qualität und Stärke der inflammatorischen Reaktionen zurückzuführen sein, welche durch die ungleichartige Spender-Empfänger-Kombination induziert wurden [72, 136]. In diesem Zusammenhang könnte zudem die chemische Natur der inflammatorischen Mediatoren eine signifikante Rolle spielen, wie es in den Vergleichsstudien für Inseltoxizität von STZ und Alloxan demonstriert wurde [80, 81, 143].

Ob die Normoglykämie nach TX von Schweineinseln in diabetische Nacktratten zumindest teilweise auf eine mögliche stimulatorische Kapazität von NA auf  $\beta$ -Zellreplikation zurückzuführen ist [122, 159], muss abgeklärt werden. Eine Zunahme der Replikationsrate in transplantierten Großtierinseln, wie sie in murinen isologen Inseltransplantaten festgestellt wurde [123], ist zum heutigen Zeitpunkt spekulativ [124].

Die Daten der vorliegenden Studie, die bei den diabetischen Kontrollen sowie den mit NA behandelten, scheintransplantierten Ratten erhoben wurden, bestätigt die ungünstige Wirkung von NA auf die Insulinsekretion, die an Ratteninseln [112] und diabetischen Patienten mit Inselrestfunktion [78] nachgewiesen wurde. Nach Beobachtungen bei syngen transplantierten Ratten [48] ist die Normalisierung der Serumglukose eine essentielle Voraussetzung für die Regeneration von verbleibenden Empfängerinseln bei mit NA behandelten Nacktratten mit funktionierenden Xenotransplantaten. Die nach TX resultierende Normoglykämie scheint eher ein Sekundäreffekt des NA-vermittelten Transplantatschutzes zu sein, als eine direkte, replikatorische Stimulation der verbleibenden pankreatischen  $\beta$ -Zellen.

Wenn die gewonnenen Erkenntnisse aus dieser Studie für die klinische Praxis angewendet werden, müssen die Nebenwirkungen einer wirksamen Dosis von 1.000 mg NA/kg/Tag bei Inselempfängern von Typ-I-Diabetes berücksichtigt werden. Die mit Ratten durchgeführten NA-Studien zeigen, dass eine langfristige Applikation mit hochdosiertem NA zu Hypertrophie der Leber und einer verstärkten hepatischen Lipideinlagerung führt [64, 116].

Neuere Studien an großen Patientenkontingenten weisen darauf hin, dass bei Verwendung von gereinigten NA-Präparaten eine tägliche Dosis von bis zu 6g/Tag ohne Nebenwirkungen toleriert wird [160]. Diese Dosis könnte einen signifikanten Schutz allogener Inseltransplantaten bewirken, da die speziesabhängige Metabolisierung von NA bis zu dem sechsfach höheren NA-Plasmaspiegel im Vergleich zu Ratten führt [153].

In der vorliegenden Studie wurde demonstriert, dass hochdosiertes NA frisch isolierte, adulte Schweineinseln in einem inflammatorischen Milieu nach intraportal TX in diabetische, athymische Ratten wirksam schützen kann. Jedoch muss zu einem effektiven Schutz von xenogenen Inseltransplantaten NA in höheren Dosen als in syngen Nagermodellen appliziert werden. Unsere Daten demonstrierten weiterhin, dass das Transplantatüberleben vorwiegend durch den Schutz der Schweineinseln vor letaler Energiedepletion und nicht durch die Behinderung der hepatischen NO-Bildung verbessert wurde.

#### 4.4 Hitzeschockproteine

In der vorliegenden Studie wurde erstmals bei Inseln nachgewiesen, dass eine hyperthermische Vorbehandlung des Transplantates das Überleben nach TX signifikant reduziert. Gleichzeitig konnten unsere in-vitro-Studien die Ergebnisse früherer Untersuchungen an Nagerinseln bestätigen, die deutlich zeigten, dass eine HSP-70-Überexpression die Resistenz von Inseln gegenüber inflammatorischen Mediatoren wie NO, O<sub>2</sub>-Radikalen oder Zytokine signifikant erhöht [7, 8, 90]. Allerdings scheint hierbei der HSP-70 vermittelte Schutz bei Schweineinseln nicht so ausgeprägt zu sein wie bei Ratteninseln. Dies könnte zum einen auf die verwendete Konzentration an NO und O<sub>2</sub>-Radikalen zurückzuführen sein, die im Vergleich zu den zitierten Studien um ein vielfaches höher lag. Zum anderen sind bei einer vergleichenden Diskussion auch die speziesabhängige Variabilität der intrinsischen Schutz- und Reparaturmechanismen zu berücksichtigen [9, 12, 150].

Die höchste strukturelle Ähnlichkeit zwischen Stressproteinen aus unterschiedlichen Spezies ist im aminoterminalen Ende zu finden, welches eine ATPase-Aktivität besitzt. Das carboxylterminale Ende, dem eine Kontrollfunktion bei der Substraterkennung zuerkannt wird, enthält eine nicht konservierte Domäne, die die Funktion von Stressproteinen in einer speziesabhängigen Weise bestimmt [27, 79].

Obwohl die Stressproteine, insbesondere HSP-70, im Verlauf der Evolution im hohen Masse konserviert wurden [148], sollten die spezies-abhängigen Unterschiede zwischen Schweine- und Nager-HSPs nicht ausgeschlossen werden. Die unterschiedliche Kinetik der hitze-induzierte HSP-Synthese in Schweine- und Ratteninseln deuten ebenfalls auf unterschiedliche Mechanismen der Stressprotein-Expression hin. Dies schließt neben der HSP-Synthese auch die hitzeinduzierte Expression von Hämoxxygenase und von weiteren Radikalfängern wie Superoxid-Dismutase und Katalase ein, die in verschiedenen Rattengewebe beobachtet wurde [8, 31, 129] bei humanen und porzinen Geweben aber nicht nachgewiesen werden konnte [14, 26, 71].

Weiterhin ist bei vergleichenden Betrachtungen verschiedener Studien die Variabilität der verwendeten Protokolle zur hyperthermischen HSP-Induktion, hinsichtlich der Expositionsdauer und Temperaturhöhe, zu berücksichtigen [52].

Die Diskussion darüber, welche Mechanismen das frühe Inseltransplantat-Überleben nach einer hyperthermischen Inselvorbereitung vermindern, ist aufgrund der reduzierten Datenlage im Augenblick spekulativ. Die Ergebnisse aus den in-vitro-Qualitätskontrollen von hitzeexponierten und scheinbehandelten Inseln zeigen, dass die glukosestimulierte Insulinsekretion geringfügig, aber signifikant reduziert wurde. Der intrazelluläre Insulingehalt des Transplantates, der als relevanter Parameter für das Transplantat-Überleben in den normoglykämischen Empfängern gemessen wurde, blieb jedoch von einer Hitzeschockbehandlung unbeeinflusst.

Die Ergebnisse aus den Qualitätskontrollen der hitzeexponierten und scheinbehandelten Inseln deuten darauf hin, dass eine 90minütige Hyperthermie nicht die Viabilität der Schweineinseln reduziert. Der gleiche Stimulus könnte dennoch Apoptose in Zellen unterschiedlicher Organe auslösen [40, 42]. Auf der anderen Seite kann eine HSP-70-Induktion vor einer proapoptotischen Behandlung Apoptose entgegenwirken [25, 97, 137]. Es ist anzunehmen, dass bestimmte speziesabhängige Temperaturniveaus existieren, die das kritische Gleichgewicht zwischen hitzeinduziertem Zellschutz und Apoptose nach Hyperthermie aufrechterhalten. Neuere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigen eindeutig, dass ein Hitzeschock bei 43°C zu einer signifikanten Expressionserhöhung proapoptotischer Proteine wie Bax, Fas, FasL und DFF führt. Eine Reduzierung auf 41°C verhinderte zwar einen signifikanten Anstieg dieser Proteine, blockierte aber auch gleichzeitig eine signifikante Induktion von HSP-27, -70 und -90 [13].

Diese Daten demonstrieren den dualen Charakter der zellulären Stressreaktion, die simultan Mechanismen zur Protektion und zur Selbstzerstörung startet.

Von besonderer Bedeutung für die Reduzierung des frühen Transplantat-Überlebens implantierter Schweineinseln könnte insbesondere die hitzeinduzierte Hochregulation von Fas auf den Zellen des Transplantates sein. Als Effektorzellen eines beschleunigten Zelltodes bzw. einer Abstoßung wären hierbei HSP-reaktive  $\gamma\delta$ -T-Zellen, die keinerlei MHC-Restriktion aufweisen, zu nennen. Diese  $CD4^-$ ,  $CD8^-$ -T-Zellen werden außerordentlich schnell aktiviert und können den Implantationsort noch vor den Makrophagen erreichen [67, 152].



Durch Konektion von überexprimiertem Fas mit dem von den T-Zellen exprimierten Fas-Liganden (FasL) wird eine apoptotische Kaskade ausgelöst, die letztendlich zum Zelltod führt. Dieser Mechanismus, der zudem durch die simultane Expression von Fas und FasL auf hitzeexponierten Schweineinseln begünstigt wird [13], wurde auch in humanen  $\beta$ -Zellen, die einem inflammatorischen Milieu ausgesetzt wurden, nachgewiesen [86, 130].

Weiterhin scheint eine HSP-Überexpression den Fas-FasL vermittelten Zelltod durch Erhöhung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels zu begünstigen [85].

Klinische und experimentelle Studien an allogenen Herzen zeigen, dass in diesem Zusammenhang auch eine HSP-vermittelte Erhöhung der Antigenität hitzeexponierter Gewebe zu nennen ist, die zu einer verstärkten Infiltration von HSP-reaktiven Lymphozyten führt [36, 126].

Im Gegensatz dazu wies eine einzelne Studie allerdings nach, dass Hyperthermie zu einer Reduktion der Antigenexpression führen kann [93]. Dies wurde auch durch in-vitro-Experimente bestätigt, die nach einer hyperthermischen Vorbehandlung von murinen, thyreoidallen Allotransplantaten eine signifikante Zunahme der Überlebensrate zeigten [4].

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass eine hyperthermisch induzierte HSP-70-Expression in isolierten Schweineinseln in einer signifikanten Zunahme der Inselresistenz gegenüber hochdosiertem NO und  $\text{H}_2\text{O}_2$  resultiert. Gleichzeitig wurde jedoch das frühe Transplantatüberleben von hitzegeschockten Schweineinseln nach TX unter die Nierenkapsel von immunkompetenten, nicht diabetischen Lewis-Ratten reduziert.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Das Hauptziel der klinischen Inseltransplantation ist eine langfristige Insulinunabhängigkeit bei Typ-I-Diabetikern zu erreichen um das Auftreten und die Entwicklung der diabetes-spezifischen Sekundärkomplikationen zu verhindern. Die Erfolge dieser Therapieform waren bisher gering. Neuere Immunsuppressionsprotokolle führten aber zu beachtlichen Fortschritten bei der Insulinunabhängigkeit transplantierter Patienten.

Die Zielsetzung der klinischen Inseltransplantation wird durch die Auswahl der Leber als bevorzugter Implantationsort für Inseln erschwert, da ortsständige Makrophagen, endotheliale Zellen und Hepatozyten durch Sezernierung inflammatorischer Mediatoren eine Funktion des Transplantates verringern.

Die Anwendung gezielter antiinflammatorischer Strategien würde eine Dosisreduzierung diabetogener Immunsuppressiva ermöglichen und das frühe Transplantatüberleben unterstützen.

Als Modell wurde die intraportale Transplantation von isolierten Schweineinseln in diabetische, athymische (T-zelldefiziente) Nacktratten gewählt.

Durch die Applikation hochselektiver iNOS-Inhibitoren, wie SMT und AE-ITU, wurde im Vergleich mit dem Steroidhormon DXM und L-NMMA, einem unselektiven iNOS-Inhibitor, die intrahepatischen NO-Synthese nach intraportaler Transplantation von Schweineinseln ohne erkennbare Nebenwirkungen wirksam und vollständig gehemmt. Als Folge der supprimierten NO-Synthese wurde die Transplantatfunktion in den mit hochselektiven Isothioureaten behandelten Tiergruppen hochsignifikant verlängert.

Hochdosiertes NA kann Schweineinseln nach intraportaler Transplantation in Nacktratten signifikant schützen. Es wurde demonstriert, dass das verbesserte Transplantatüberleben nicht durch Suppression der hepatischen iNOS, sondern durch den Schutz der Schweineinseln vor letaler Energiedepletion vermittelt wurde.

Die hitzeinduzierte HSP-70-Expression in isolierten Schweineinseln resultierte in einer signifikanten Zunahme der Inselresistenz in-vitro gegenüber hochdosiertem NO und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Dagegen wurde die frühe Transplantatfunktion von isolierten Schweineinseln nach HSP-70-Induktion und Transplantation unter die Nierenkapsel von euthymischen Lewis-Ratten jedoch verringert. Als Ursache für diese Beobachtung wurde eine hitzeinduzierte Erhöhung der Inselimmunogenität und Apoptoserate diskutiert.

Aus den Resultaten der vorliegenden Arbeit wird gefolgert, dass eine begleitende, antiinflammatorische Therapie nach intraportaler Insel-TX zur Dosisreduzierung diabetogener Immunsuppressiva möglich sein sollte.

## 6. SUMMARY

The main goals of clinical islet transplantation are to achieve long-term insulin independence in type 1 diabetic patients and to prevent secondary complications.

Although the liver has been characterized as the favourite implantation site for human islets, studies clearly indicate that intraportally transplanted islets are exposed to resistant macrophages, endothelial cells and activated hepatocytes, which mediate early islet dysfunction by cytokines and rapid activation of iNOS.

In the present study isolated adult pig islets were transplanted into diabetic T-cell deficient (athymic) and euthymic nude rats to evaluate the effect of different islet-protective anti-inflammatory strategies.

The application of highly specific iNOS inhibitors, such as SMT and AE-ITU, completely suppressed posttransplant induction of iNOS without any obvious side effects as observed with the corticosteroid dexamethasone or the unspecific iNOS inhibitor L-NMMA.

Highly dosed nicotinamide significantly enhanced pig islet function after intraportal transplantation into diabetic nude rats. The data suggest that protection seemed to be mediated through prevention of lethal energy depletion rather than interference with hepatic NO generation.

The heat-induced expression of HSP-70 in isolated pig islets resulted in a significant increase of islets in vitro resistance against highly concentrated NO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The conflicting observation that pretransplant heat exposure decreased pig islet xenograft survival in normal rats implies the induction of apoptosis and/or enhancement of islet immunogenicity.

The data of the present study suggests that administration of highly dosed nicotinamide and specific iNOS inhibitors may facilitate the reduction of anti-inflammatory drugs associated with diabetogenic side effects. The induction of protective heat shock proteins performed prior to transplantation needs further evaluation.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Andersen HU, Jørgensen KH, Egeberg J, Mandrup-Poulsen T, Nerup J (1994) Nicotinamide prevents interleukin-1 effects on accumulated insulin release and nitric oxide production in rat islets of Langerhans. *Diabetes* 43: 770-777.
2. Asayama K, Kooy NW, Burr IM (1986) Effect of vitamin E deficiency and selenium deficiency on insulin secretory reserve and free radical scavenging systems in islets: Decrease of islet manganosuperoxide dismutase. *J Lab Clin Med* 107: 459-464.
3. Ballinger WF, Lacy PE (1972) Transplantation of intact pancreatic islets in rats. *Surgery* 72: 175-186.
4. Bartlett ST, Ward RE (1989) Pretransplant hyperthermia promotes permanent survival of murine thyroid allografts. *J Surg Res* 46: 370-373.
5. Beattie GM and Hayek A (1993) Islet cell mass and longevity of islet grafts in diabetic rats. *Cell Transplant* 2: 119-122.
6. Behboo R, Lancaster JR, Sweetland M, Korbanic C, Hoffman R, Simmons RL, Ricordi C (1994) Nitric oxide generation following intrahepatic human-to-rat islet transplantation is blocked by  $N^G$ -monomethyl-L-arginine. *Transplant Proc* 26: 776.
7. Bellmann K, Jäättelä M, Wissing D, Burkart V, Kolb H (1996) Heat shock protein hsp70 overexpression confers resistance against nitric oxide. *FEBS Lett* 391: 185-188.
8. Bellmann K, Wenz A, Radons J, Burkart V, Kleemann P, Kolb H (1995) Heat shock induces resistance in rat pancreatic islet cells against nitric oxide, oxygen radicals and streptozotocin toxicity in vitro. *J Clin Invest.* 95: 2840-2845.
9. Benhamou PY, Monscotm C, Richardm MJ, Beatrix O, Badet L, Pattou F, Kerr-Conte J, Chroboczek J, Lemarchand P, Halimi S (1998) Adenovirus-mediated catalase gene transfer reduces oxidant stress in human, porcine and rat pancreatic islets. *Diabetologia* 41: 1093-1100.
10. Bennet W, Groth CG, larsson R, Nilsson B, Korsgen O (2.000) Isolated human islets trigger an instant blood mediated inflammatory reaction: implication for intraportal islet transplantation as a treatment for patients with type 1 diabetes. *Ups J Med Sci* 105 (2): 125-133.

11. Bottino R, Fernandez LA, Ricordi C, Lehmann R, Tsan MF, Oliver R, Inverardi L (1998) Transplantation of allogeneic islets of Langerhans in the rat liver. Effects of macrophage depletion on graft survival and microenvironment activation. *Diabetes* 47: 316-323.
12. Brandhorst D, Brandhorst H, Hering BJ, Eckhard T, Jahr H, Federlin K, Bretzel RG (1997) ATP content of isolated islets: Indication for species-dependent vulnerability for cell-mediated graft rejection? *Transplant Proc* 29: 2058.
13. Brandhorst D, Brandhorst H, Kumarasamy V, Maataoui A, Alt A, Brendel MD and Bretzel RG (2003) Hyperthermic preconditioning protects islet grafts from early inflammation but enhances rejection in immunocompetent mice. *Cell Transplantation* 12: 859-865.
14. Brandhorst D, Hammes HP, Brandhorst H, Zwolinski A, Nahidi F, Alt A and Bretzel RG (2000) Pretransplant Induction of HSP-70 in isolated adult pig islets decreases early islet xenograft survival. *Cell Transplantation* 9: 423-430.
15. Brandhorst H (1992) Isolierung, Reinigung und Transplantation Langerhansscher Inseln des Schweins unter besonderer Berücksichtigung von Kultivierung und Kryopräservierung isolierter Inseln. Dissertation, Giessen.
16. Brandhorst H, Brandhorst D, Hering BJ, Bretzel RG (1999) Significant progress in porcine islet mass isolation utilizing Liberase HI for enzymatic low temperature pancreas digestion. *Transplantation* 68: 355-361.
17. Brendel MD, Eckhard M, Brandhorst D, Brandhorst H, Winter D, Jäger H et al., (2003) Inselzelltransplantation – aktueller Stand und Perspektiven, *Diabetes und Stoffwechsel* 12: 239-252.
18. Brendel MD, Hering BJ, Schultz AO, Bretzel RG (1999) International Islet Transplant Registry 8: 1.
19. Bretzel RG (1985) Pathogenese und Therapie des Diabetes mellitus. *Med Welt* 36: 927.
20. Bretzel RG (1996) Insel- und Pankreastransplantation bei Diabetes. *Therapeutische Umschau*, Band 53, Heft 12: 889-901.
21. Bretzel RG, Eckhard M und Brendel MD (1998) Inselzelltransplantation bei Typ-I-Diabetes mellitus. *Spiegel der Forschung*, 15 Jg./Nr. 1: 5-24.

22. Bretzel RG, Federlin K (1987) Pankreas- und Inseltransplantation bei Diabetes mellitus. *Internist* 28: 254.
23. Bretzel RG, Hering BJ, Federlin K (1992) Islet transplantation registry report 1991. *Diab Nutr Metab* 5 (Suppl. 1): 177-181.
24. Bretzel RG, Hering BJ, Stroedter D, Zekorn T, Federlin KF (1992) Experimental islet transplantation in small animals. In: *Pancreatic Islet Cell Transplantation*, Ricordi C, Ed. R. G. Lande, Austin, Georgetown, 249-260.
25. Buzzard KA, Giaccia AJ, Killender M, Anderson RL (1998) Heat shock protein 72 modulates pathways of stress-induced apoptosis. *J Biol Chem* 273: 17147-17153.
26. Caltabiano MM, Koestler TP, Poste G, Greig RG (1986) Induction of 32- and 34-kDa stress proteins by sodium arsenite, heavy metals, and thiol-reactive agents. *J Biol Chem* 261: 13381-13386.
27. Carper SW, Duffy JJ, Gerner EW (1987) Heat shock proteins in thermotolerance and other cellular processes. *Cancer Res* 47: 5249-5255.
28. Cetkovic-Cvrlje M, Sandler S, Eizirik DL (1993) Nicotinamide and dexamethasone inhibit interleukin 1-induced nitric oxide production by RINm5F cells without decreasing messenger ribonucleic acid expression for nitric oxide synthase. *Endocrinology* 133: 1739-1743.
29. Chance RE (1972) Amino acid sequences of proinsulins and intermediates. *Diabetes* 21: 461.
30. Cooper DKC, Ye Y, Rolf jr LL, Zuhdi N (1991) The pig as potential organ donor for man. In: Cooper DKC, Kemp E, Reemtsma K, White DJG [Hrsg.]: *Xenotransplantation. The transplantation of organs and tissues between species*. 481-500.
31. Currie RW, Karmazyn M, Kloc M, Mailer K (1988) Heat shock response is associated with enhanced postischemic ventricular recovery. *Circ Res* 63: 543-549.
32. Dayhoff M (1978) *Atlas of Protein Sequence and Structure*, vol 5, Suppl 3. Natl Biomedical Research Foundation, Silver Spring, MD.
33. De Kimpe SJ, Hunter ML, Bryant CE, Thiemermann C, Vane JR (1995) Delayed circulatory failure due to the induction of nitric oxide synthase by lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* in anaesthetized rats. *Br J Pharmacol* 114: 1317.

34. Delaney CA, Pavlovic D, Hoorens A, Pipeleers DG, Eizirik DL (1997) Cytokines induce deoxyribonucleic acid strand breaks and apoptosis in human pancreatic islet cells. *Endocrinology* 138: 2610-2614.
35. Deng S, Ketchum RJ, Kucher T, Weber M, Naji A, Brayman KL (1996) NK cell and humoral immune responses are dominant in primary non-function of islet grafts in the dog-to-rat xenotransplant model. *CellTransplant* 5 (suppl): 32S.
36. Duquesnoy RJ, Liu K, Fu XF, Murase N, Ye Q, Demetris AJ (1999) Evidence for heat shock protein immunity in rat cardiac allograft model of chronic rejection. *Transplantation* 67: 156-164.
37. Eizirik DL, Sandler S, Welsh N, Bendtzen K, Hellerstrom C (1994) Nicotinamide decreases nitric oxide production and partially protects human pancreatic islets against the suppressive effects of combinations of cytokines. *Autoimmunity* 19: 193-198.
38. El-Ouaghghi A, Jahr H, Pfeiffer G, Hering BJ, Brandhorst D, Brandhorst H, Federlin K, Bretzel RG (1999) Cytokine mRNA expression in peripheral blood cells of immunosuppressed human islet transplant recipients. *J Mol Med* 77: 115-117.
39. Federlin KF, Bretzel RG, Hering B (1992) Experimentelle und klinische Inseltransplantation. *Gegenwärtiger Stand. Zentrbl Chir* 117: 670-676.
40. Fehsel K, Kröncke KD, Meyer KL, Huber H, Wahn V, Kolb-Bachofen V (1995) Nitric oxide induces apoptosis in mouse thymocytes. *J Immunol* 155: 2858-2865.
41. Fioretto P, Steffes MW, Sutherland DE, Goetz FC, Mauer M (1998) Reversal of lesions of diabetic nephropathy after pancreas transplantation. *N Engl J Med* 339: 69-75.
42. Fuse T, Yoon KW, Kato T, Yamada K (1998) Heat-induced apoptosis in human glioblastoma cell line A172. *Neurosurgery* 42: 843-849.
43. Gotoh M, Maki T, Satomi S, Porter J, Monaco AP (1986) Immunological Characteristics of Purified Pancreatic Islet Grafts. *Transplantation* 42: 387-390.
44. Grankvist K, Marklund SL, Täljedal IB (1981) CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. *Biochem J* 199: 393-398.
45. Gray D, Sutton R, McShane P, Peters M, Morris P (1988) Exocrine contamination impairs of pancreatic islets transplantation beneath the kidney capsule. *Journal of Surgical Research* 45: 432-442.



46. Gross CR, Zehrer CL (1992) Health-related quality of life outcomes of pancreas transplant recipients. *Clin Transplant* 6: 165-171.
47. Groth CG, Tibell A, Wennberg L, Korsgen O. (1999) Xenoislet transplantation: experimental and clinical aspects. *J Mol Med* vol 77/Nr1: 153-154.
48. Hahn HJ, Lucke S, Ziegler B, Besch W, Kauert C (1985) Effects of islet transplantation on the recipient endocrine pancreas. *Biomed Biochim Acta* 44: 137-142.
49. Hauschildt S, Scheipers P, Bessler WG (1991) Inhibitors of poly (ADP ribose) polymerase suppress lipopolysaccharide-induced nitrite formation in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 179: 865-871.
50. Hedrich HJ, Wonigeit K, Schwinzer R (1987) In vivo alloreactivity and xenoreactivity of athymic nude rats. *Transplant Proc* 19: 3199.
51. Heller B, Wang ZQ, Wagner EF, Radons J, Bürkle A, Fehsel K, Burkart V, Kolb H (1995) Inactivation of the poly (ADP-ribose) polymerase gene affects oxygen radical and nitric oxide toxicity in islet cells. *J Biol Chem* 270: 11176-11180.
52. Helqvist S, Hansen BS, Johannesen J, Andersen HU, Nielsen JH, Nerup J (1989) Interleukin-1 induces new protein formation in isolated rat islets of Langerhans. *Acta Endocrinol (Copenh)* 121: 136-140.
53. Hering BJ, Geier C, Schultz AO, Bretzel RG, Federlin K (1994) International Islet Transplant Registry 5: 1.
54. Hiller WFA, Klempnauer J, Lück R, Steiniger B (1991) Progressive deterioration of endocrine function after intraportal but not kidney subcapsular rat islet transplantation. *Diabetes* 40: 134-140.
55. Holstad M, Jansson L, Sandler S (1996) Effects of aminoguanidine on rat pancreatic islets in culture and on the pancreatic islet blood flow of anaesthetized rats. *Biochem Pharmacol* 51: 1711-1717.
56. Hoorens A and Pipeleers D (1999) Nicotinamide protects human beta cells against chemically-induced necrosis, but not against cytokine-induced apoptosis. *Diabetologia* 42: 55.
57. Jäger C, Hering BJ, Dyrberg T, Federlin K, Bretzel RG (1996) Islet cell antibodies and glutamic acidcarboxylase antibodies in patients with insulin-dependent diabetes mellitus undergoing kidney and islet-after-kidney transplantation. *Transplantation* 62: 424-426.

58. Jahr H, Brandhorst D, Brandhorst H, Brendel MD, Eckhardt T, El-Quaghli A, Hußmann B, Lau D, Nahidi F, Wacker T, Zwolinski A, Bretzel RG (1998) Abstoßungsreaktionen bei der tierexperimentellen xenogenen Transplantation von isolierten Langerhansschen Inseln des Schweins. *Zentralblatt für Chirurgie* 123: 823-829.
59. Jahr H, Pfeiffer G, Hering BJ, Federlin K, Bretzel RG (1999) Endotoxin-mediated activation of cytokine production in human PBMCs by collagenase and Ficoll. *J Mol Med* 77: 118.
60. Jidal RM (1997) Immune privileged sites for pancreatic islet transplantation. *Pancreas* 14 (3): 313-316.
61. Jindal RM (1994) Pancreatic islet transplantation for diabetes. *Postgrad Med J* 70 (827): 665-666.
62. Jindal RM, Sidner RA, McDaniel HB, Johnson MS, Fineberg SE (1998) Intraportal vs kidney subcapsular site for human pancreatic islet transplantation. *Transplant Proc* 30: 398-399.
63. Kallmann B, Burkart V, Kröncke KD, Kolb-Bachofen V, Kolb H (1992) Toxicity of chemically generated nitric oxide towards pancreatic islet cells can be prevented by nicotinamide. *Life Sci* 51: 671-678.
64. Kang-Lee YA, McKee RW, Wright SM, Swendseid ME, Jenden DJ, Jope RS (1983) Metabolic effects of nicotinamide administration in rats. *J Nutr* 113: 215-221.
65. Kasper H (2000) *Ernährungsmedizin und Diätetik*, 9. Auflage, München Jena: Urban und Fischer Verlag.
66. Kauffman jr HM, Ellison MD, Pierce GA, Graham WK, Daily OP (1996) Increasing donor-recipient imbalance justes xenograft research. *Transplant Proc* 28 (2): 849-850.
67. Kaufmann S H E , Kabelitz D (1991) Gamma/delta T lymphocytes and heat shock proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 167: 191-207.
68. Kemp CB, Knight MJ, Scharp DW, Ballinger WF, Lacy PE (1973) Effect of transplantation site on the results of pancreatic islet isografts in diabetic rats. *Diabetologia* 9: 486-491.

69. Kengatharan KM, De Kimpe SJ, Thiernemann C (1996) Role of nitric oxide in the circulatory failure and organ injury in a rodent model of gram-positive shock. *Br J Pharmacol* 119: 1411.
70. Kenmochi T, Mullen Y, Miyamoto M, Stein E (1994) Protection of mouse islet isografts from early transplantation damage by nicotinamide treatment of recipients. *Transplant Proc* 26: 693.
71. Keyse SM, Tyrrell RM (1987) Both near ultraviolet radiation and the oxidizing agent hydrogen peroxide induce a 32-kDa stress protein in normal human skin fibroblasts. *J Biol Chem* 262: 14821-14825.
72. Korsgren O, Jansson L (1991) Characterization of mixed syngeneic-allogeneic and syngeneic-xenogeneic islet graft rejection in mice: evidence of functional impairment of the remaining syngeneic islets in xenograft rejection. *J Clin Invest* 93: 1113.
73. Korsgren O, Jansson L (1994) Porcine islet-like cell clusters cure diabetic nude rats when transplanted under the kidney capsule, but not when implanted into the liver or spleen. *Cell Transplant* 3: 49-54.
74. Kröncke KD, Rodriguez ML, Kolb H, Kolb-Bachofen VK (1993) Cytotoxicity of activated rat macrophages against syngeneic islet cells is arginine-dependent, correlates with citrulline and nitrite concentrations and is identical to lysis by the nitric oxide donor nitroprusside. *Diabetologia* 36: 17-24.
75. Kunz D, Walker G, Eberhardt W, Pfeilschifter J (1996) Molecular mechanisms of dexamethasone inhibition of nitric oxide synthase expression in interleukin 1 $\beta$ -stimulated mesangial cells: Evidence for the involvement of transcriptional and posttranscriptional regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 255.
76. Kuo PC, Schroeder RA (1995) The emerging multifaceted roles of nitric oxide. *Annals of Surgery* 221: 220-235.
77. La Rocca E, Fiorina P, di Carlo V, Astorri E, Rossetti C, Lucignani G, Fazio F et al., (2001) Cardiovascular outcomes after kidney-pancreas and kidney alone transplantation. *Kidney International* 60: 1964-1971.
78. Lampeter EF, Klinghammer A, Scherbaum WA, Heinze E, Haastert B, Giani G, Kolb H and the DENIS Group (1998) The Deutsche nicotinamide intervention study. An attempt to prevent type I diabetes. *Diabetes* 47: 980-984.

79. Langer T, Neupert W (1991) Heat shock proteins hsp60 and hsp70: Their roles in folding, assembly and membran translocation of proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 167: 3-30.
80. Lazarow A, Liambies J, Tausch AJ (1950) Protection against diabetes with nicotinamide. *J Lab Clin Med* 36: 249-258.
81. Lazarus SS and Shapiro SH (1973) Influence of nicotinamide and pyridine nucleotides on streptozotocin and alloxan-induced pancreatic B cell cytotoxicity. *Diabetes* 22: 499-506.
82. Leitzmann C, Müller C, Michel P, Breme U, Hahn A und Laube H (2001) Ernährung in Prävention und Therapie, Hippokrates Verlag, Stuttgart, 240.
83. Lenzen S, Drinkgern J, Tiedge M (1996) Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic Biol Med* 16: 463-466.
84. Leslie RD (1999) United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS): what now or so what? *Diabetes Metab Rev* 15: 65-71.
85. Liossis SNC, Ding XZ, Kiang JG, Tsokos GC (1997) Overexpression of the heat shock protein 70 enhances the TCR/CD3- and Fas/Apo-1/CD95-mediated apoptotic cell death in Jurkat T cells. *J Immunol* 158: 5668-5675.
86. Loweth AC, Williams GT, James RFL, Scapello, JHB, Morgan NG (1998) Human islets of Langerhans express Fas ligand and undergo apoptosis in response to interleukin-1 $\beta$  and Fas ligation. *Diabetes* 47: 727-732.
87. Malaisse WJ, Malaisse-Lagae F, Sener A, Pipeleers DG (1982) Determinants of the selective toxicity of alloxan to the pancreatic B cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 927-930.
88. Mandel TE, Koulmanda M, Lodovaris T, Bacelj A (1998) Islet grafts in Nod mice: a comparison of iso-, allo-, and pig xenografts. *Transplantat proc* 21: 3813-3814.
89. Mandrup-Poulsen T, Reimers JI, Andersen HU, Pociot F, Karlsen AE, Bjerre U, Nerup J (1993) Nicotinamide treatment in the prevention of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diab Metab Rev* 9: 295-309.

90. Margulis BA, Sandler S, Eizirik DL, Welsh N, Welsh M (1991) Liposomal delivery of purified heat shock protein hsp70 into rat pancreatic islets as protection against interleukin 1 $\beta$ -induced impaired  $\beta$ -cell function. *Diabetes* 40: 1418-1422.
91. Mathews N, Neale ML, Jackson SK, Stark JM (1987) Tumor cell killing by tumor necrosis factor: inhibition by anaerobic conditions, free-radical scavengers and inhibitors of arachidonate metabolism. *Immunology* 62: 153.
92. McKeehan DA [ed.] (1995) International Pancreas Transplant Registry. Newsletter 8: 1-4.
93. Mehdi SQ, Recktenwald DJ, Smith LM, Li GC, Armour EP, Hahn GM (1984) Effect of hyperthermia on murine cell surface histocompatibility antigens. *Cancer Res* 44: 3394-3397.
94. Mendola J, Wright JR Jr, Lacy PE (1989) Oxygen free-radical scavengers and immune destruction of murine islets in allograft rejection and multiple low-dose streptozotocin-induced insulinitis. *Diabetes* 38: 379.
95. Milde FK, Hart LK, Zehr PS (1992) Quality of life of pancreatic transplant recipients. *Diabetes Care* 15: 1459-1463.
96. Morel P, Geotz F, Moudry-Munns KC, Freier E, Sutherland DER (1991) Long term metabolic control in patients with pancreatic transplants. *Ann Intern Med* 115: 694-699.
97. Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Denis-Larose C, Massie B (1997) Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 17: 5317-5327.
98. Nagai T, Yasunami Y, Nagata N, Ueki M, Ono J, Ikeda S (1995) Protective effects of nicotinamide on renal subcapsular islet isografts with a marginal mass from sustained hyperglycemia in the streptozotocin-induced diabetic rats. *Transplant Proc* 27: 3196.
99. Nava E, Palmer RMJ, Moncada S (1991) Inhibition of nitric oxide synthesis in septic shock: how much is beneficial? *Lancet* 1: 1555.
100. Navarro X, Kennndy WR, Loewensen RB, Sutherland DER (1990) Influence of pancreas transplantation on cardiorespiratory reflexes, nerve conduction, and mortality in diabetes mellitus. *Diabetes* 39: 802-806.
101. Navarro X, Sutherland DE, Kennedy WR (1997) Long-term effects of pancreatic transplantation on diabetic neuropathy. *Ann Neurol* 42: 727-736.

102. Nomikos IN, Prowse SJ, Carotenuto P, Lafferty KJ (1986) Combined treatment with nicotinamide and desferriexamine prevents islet allograft destruction in NOD mice. *Diabetes* 35: 1302.
103. Nussler AK, Carroll PB, DiSilvio M, Rilo HLR, Simmons RL, Starzel TE, Ricordi C (1992) Hepatic nitric oxide generation as a putative mechanism for failure of intrahepatic islet cells grafts. *Transplant Proc.* 24: 2997.
104. Nussler AK, DiSilvio M, Billiar TR, Hoffman RA, Geller DA, Selby R, Madariaga J, Simmons RL (1992) Stimulation of the nitric oxide synthase in human hepatocytes by cytokines and endotoxin. *J Exp Med* 176: 261-264.
105. Ohnishi ST, Barr JK (1978) A simplified method of quantitating proteins using the biuret and phenol reagents. *Anal Biochem* 86: 193-197.
106. Ou P, Wolff SP (1993) Aminoguanidine: a drug proposed for prophylaxis in diabetes inhibits catalase and generates hydrogen peroxide in vitro. *Biochem Pharmacol* 46: 1139-1144.
107. Parakevas S, Maysinger D, Wang R, Duguid TP, Rosenberg L (2000) Cell loss in isolated human islets occurs by apoptosis. *Pancreas*, 20 (3): 270-276.
108. Patience C, Takeuchi Y, Weiss RA (1997) Infection of human cells by endogenous retrovirus of pigs. *Nature med* 3: 282-286.
109. Petzold R und Nassauer L (1995) Diättherapie des Diabetes mellitus. In: Huth k. und Kluthe R. [Hrsg.] *Lehrbuch der Ernährungstherapie*, 2. Auflage., Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag, 172-198.
110. Punjabi CJ, Laskin JD, Hwang SM, MacEachern L, Laskin DL (1994) Enhanced production of nitric oxide by bone marrow cells and increased sensitivity to macrophage colony-stimulating factor (CSF) and granulocyte-macrophage CSF after benzene treatment of mice. *Blood* 83: 3255-3263.
111. Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL, Strynadka K, Schulz R, Lakey JRT, Warnock GL, Rajotte RV (1994) Human pancreatic islet  $\beta$ -cell destruction by cytokines is independent of nitric oxide production. *J Clin Endocrinol Metab* 79: 1058-1062.
112. Reddy S, Salari-Lak N, Sandler S (1995) Long-term effects of nicotinamide-induced inhibition of poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase activity in rat pancreatic islets exposed to interleukin-1 $\beta$ . *Endocrinology* 136: 1907-1912.

113. Reece-Smith H, Du Toit DF, McShane P, Morris PJ (1981) Prolonged survival of islet allografts transplanted beneath the renal capsule. *Transplantation* 31: 305-306.
114. Riabowol KT, Mizzen LA, Welch WJ (1988) Heat shock is lethal to fibroblasts microinjected with antibodies against hsp70. *Science* 242: 433-436.
115. Ricordi C, Gray DWR, Hering BJ, Kaufman DB, Warnock GL, Kneteman NM, Lake SP, et al (1990) Islet isolation assessment in man and large animals. *Acta Diabetol Lat* 27: 185-195.
116. Rikans LL, Arata D, Cederquist DC (1965) fatty livers produced in albino rats by excess niacin in high fat diets. II. Effect of choline supplements. *J Nutr* 85: 107-112.
117. Römpf (1999) *Kompakt Lexikon Biochemie und Molekularbiologie*, Hrsg. Pühler A; Stuttgart, Newyork: Thieme.
118. Ruetten H, Thiemermann C (1996) Prevention of the expression of inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine or amino-ethyl-isothiourea in macrophages and in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 225: 525.
119. Ryan EA, Lakey JR, Patsy BW, Imes S, Korbitt GS, Kneteman NM, Bigam D et al., (2002) Successful islet transplantation: continued insulin reverse provides long-term glycemic control. *Diabetes* 51: 2148-2157.
120. Ryan EA, Lakey JR, Rajotte RV, Korbitt GS, Kin T, Imes S, Rabinovitch A et al., (2001) linical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmomnton protocol. *Diabetes* 50: 710-719.
121. Salvemini D, Settle SL, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG, Needleman P (1995) Regulation of prostaglandin production by nitric oxide; an in vivo analysis. *Br J Pharmacol* 114: 1171-1178.
122. Sandler S, Andersson A (1986) Long-term effects of exposure of pancreatic islets to nicotinamide in vitro on DNA synthesis, metabolism and B-cell function. *Diabetologia* 29: 199-202.
123. Sandler S, Andersson A (1988) Stimulation of cell replication in transplanted pancreatic islets by nicotinamide treatment. *Transplantation* 46: 30-31.
124. Sandler S, Hellerstöm C, Eizirik DL (1993) Effects of nicotinamide supplementation on human pancreatic islet function in tissue culture. *J Clin Endocrinol Metab* 77: 1574-1576.

125. Sandler S, Welsh M, Andersson A (1983) Streptozotocin-induced impairment of islet B-cell metabolism and its prevention by a hydroxyl radical scavenger and inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase. *Acta Pharmacol Toxicol* 53: 392-400.
126. Schimke I, Lutsch G, Schernes U, Kruse I, Dübel HP, Pregla R, Hummel M, Meyer R, Stahl J (2000) Increased level of HSP27 but not of HSP72 in human heart allografts in relation to acute rejection. *Transplantation* 70: 1694-1697.
127. Schmidt J (1998) Die besondere Bedeutung von Vitamin E für den Diabetiker. *Med Welt* 49: 250-255.
128. Shapiro AMJ, Lakey JTR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, Kenetemann NM, Rajotte RV (2000) Islet transplantation in seven patients with type I diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 343: 230-238.
129. Shibahara S, Müller RM, Taguchi H (1987) Transcriptional control of rat heme oxygenase by heat shock. *J Biol Chem* 262: 12889-12892.
130. Stassi G, Maria de R, Trucco G, Rudert W, Testi R, Galluzzo A, Giordano C, Trucco M (1997) Nitric oxide primes pancreatic beta cells for Fas-mediated destruction in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Exp Med* 186: 1193-1200.
131. Statistisches Bundesamt [Hrsg.] (1998) Gesundheitsbericht für Deutschland, Metzler-Poeschel, Stuttgart, 237-239.
132. Stegal MD, Lafferty KJ, Kam I, Gill RG (1996) Evidence of recurrent autoimmunity in human allogeneic islet transplantation. *Transplantation* 61: 1740-1749.
133. Steiner L, Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V (1997) Endothelial cells as cytotoxic effector cells: cytokine-activated rat endothelial cells lyse syngeneic islet cells via nitric oxide. *Diabetologia* 40: 150-155.
134. Stevens RB, Ansite JD, Mills CD, Lokeh A, Rossini TJ, Saxena M, Brown RR, Sutherland DER (1996) Nitric oxide mediates early dysfunction of rat and mouse islets after transplantation. *Transplantation* 61: 1740-1749.
135. Stevens RB, Lokeh A, Ansite JD, Field MJ, Gores PF, Sutherland DER (1994) Role of nitric oxide in the pathogenesis of early pancreatic islet dysfunction during rat and human intraportal islet transplantation. *Transplant Proc.*; 26: 692.



136. Sutton R, Gray DWR, McShane P, Dallman MJ, Morris PJ (1989) The specificity of rejection and the absence of susceptibility of pancreatic islet  $\beta$  cells to nonspecific immune destruction in mixed strain islets grafted beneath the renal capsule in the rat. *J Exp Med* 170: 751.
137. Swank GM, Lu Q, Xu DZ, Michalsky M, Deitch EA (1998) Effect of acute-phase and heat-shock stress on apoptosis in intestinal epithelial cells (Caco-2) *Crit Care Med* 26: 1213-1217.
138. Szabó C, Southan GJ, Thiernemann C (1994) Beneficial effects and improved survival in rodent models of septic shock with S-methylisothiourea sulfate, a potent and selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 12472-12476.
139. Techniker Krankenkasse (2003) Diabetes mellitus Typ 2, Konzept und Realisation: nexus-Berartungsnetz im Gesundheitswesen GmbH, Odenthal, 1. Auflage.
140. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (1993) The effect of intensive treatment of diabetes on development and progression of longterm complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 329: 977-986.
141. Töller M und Gries FA (1995) Diabetes mellitus. In: Ernährungsmedizin, Biesalski HK, 1. Auflage, Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag, 303-305.
142. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354.
143. Uchigata Y, Yamamoto H, Nagai H, Okamoto H (1983) Effect of poly(ADP-ribose) synthetase inhibitor administration to rats before and after injection of alloxan and streptozotocin on islet proinsulin synthesis. *Diabetes* 32: 316-318.
144. Ueki M, Yasunami Y, Motoyama K, Funakoshi A, Ikeda S, Tanaka M (1995) The amelioration of hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic rats after the intraportal transplantation of an insufficient number of islets by nicotinamide treatment. *Transplantation* 60: 313-317.
145. Wacker T, Jahr H, Weinand S, Brandhorst H, Brandhorst D, Lau D, Hering BJ, Federlin K, Bretzel RG (1995) Different toxic effects of hydrogen peroxide, nitric oxide, and superoxide on human, pig, and rat islets of Langerhans. *Exp Clin Endocrinol* 103: 133-135.

146. Wang PH, Lau J, Chalmers TC (1993) Meta-Analysis of effects of intensive blood-glucose control on late complication of type I diabetes. *lancet* 341: 1306-1309.
147. Warnock GL, Cattral MS, Dabbs KD, Rajotte RV (1992) Experimental islet transplantation in large animals. In: Ricordi C (ed): *Pancreatic Islet Cell Transplantation*. Landes, Austin – Georgetown, 261-278.
148. Welch WJ (1992) Mammalian stress response: Cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Rev* 72: 1063-1081.
149. Welch WJ, Suhan JP (1986) Cellular and biochemical events in mammalian cells during and after recovery from physiological stress. *J Cell Biol* 103: 2035-2052.
150. Welsh N, Margulis B, Borg LA, Wiklund HJ, Saldeen J, Flodstrom M, Mello MA et al. (1995) Differences in the expression of heat-shock proteins and antioxidant enzymes between human and rodent pancreatic islets: Implications for the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Mol Med* 1: 806-820.
151. WHO Study Group on Diabetes Mellitus (1985) WHO Techn Rep Ser 727.
152. Wick G, Schett G, Amberger A, Kleindienst R, Xu Q (1995) Is atherosclerosis an immunologically mediated disease? *Immunol Today* 16: 27-33.
153. Wilkin TJ, Petley AM, Macklin BM, Renwick AJ (1993) The pharmacokinetics of nicotinamide in man and rodent. *Diabetes* 42 (Suppl 1): 221A.
154. Wilson GL, Petley AM, Macklin BM, Renwick AJ (1984) Mechanisms of streptozotocin- and alloxan- induced damage in rat B cells. *Diabetologia* 27 : 587-591.
155. Winter SL, Boyer JL (1973) Hepatic toxicity from large doses of vitamin B3 (nicotinamide). *N Engl J Med* 289: 1180.
156. Xenos ES, Farney AC, Widmer MB, Casanova D, Stevens RB, Blazar BR, Sutherland DER, Gores PF (1992) Effect of tumor necrosis factor  $\alpha$  and the soluble tumor necrosis factor receptor on insulin secretion of isolated islets of Langerhans. *Transplant Proc* 24: 2863-2864.
157. Yamada K, Nonaka K, Hanafusa T, Miyazaki A, Toyoshima H, Tarui S (1982) Preventive and therapeutic effects of large-dose nicotinamide injections on diabetes associated with insulinitis. An observation in nonobese diabetic (NOD) mice. *Diabetes* 31: 749-753.

158. Yamamoto H, Uchigata Y, Okamoto H (1981) Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose)synthetase in pancreatic islets. *Nature* 294: 284-286.
159. Yonemura Y, Takashima T, Miwa K, Miyazaki I, Yamamoto H, Okamoto H (1984) Amelioration of diabetes mellitus in partially depancreatized rats by poly(ADP-ribose) synthetase inhibitors. Evidence of islet B-cell regeneration. *Diabetes* 33: 401-404.
160. Zackheim HS, Vasily DB, Westphal ML, Hastings CW (1981) Reactions to niacinamide. *J Am Acad Dermatol* 4: 736.
161. Ziegler B, Hahn HJ, Ziegler M (1985) Insulin recovery in pancreas and host organs of islet grafts. *Exp Clin Endocrinol* 85: 53-60.
162. Zöfel P (1985) *Statistik in der Praxis*, Fischer Verlag, Stuttgart.

## 8. ANHANG

### Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADCC	Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
AE-ITU	S-(2-aminoethyl)-isothioureat
athym.	athymisch
AUC	area under curve
diab.	diabetisch
DM	Diabetes mellitus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DXM	Dexamethason
EIA	Enzym-Immun-Assay
eutym.	euthymisch
FCS	Fetal Calf Serum
FE	Filtereinsatz
FR	Filtrationsröhrchen
g	Gramm
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
Hb	Hämoglobin
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HSP	Hitzeschock-Protein
IDDM	Insulin- Dependent Diabetes Mellitus
IBMIR	Instant Blood-Mediated Inflammatory Reaction
IEQ	Inseläquivalent
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
ip.	intraperitoneal
IRI	immunreaktives Insulin
Kap.	Kapitel
kD	Kilodalton
KGW	Körpergewicht

---

L	Liter
L-NMMA	L-N <sup>G</sup> -Monomethyl-Arginin
m	Milli
M	Mol
μ	mikro
MHC	Major Histocompatibility Complex
Min.	Minute
MSG	mittlere Serumglukose
MTF	mittlere Transplantatfunktion
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
n	Anzahl
NA	Nikotinamid
NIDDM	Non Insulin-Dependent Diabetes Mellitus
NAD	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NO	Stickoxid
NNP	Natrium-Nitroprusside
ns	nicht signifikant
OP	Operation
osmot.	osmotisch
pankreat.	pankreatisch
PARP	Poly(ADP-Ribose)Polymerase
RIA	Radio-Immunoassay
s.c.	subkutan
sec.	Sekunde
SEM	Standard Error of Mean
SMT	S-Methyl-Isothioureat
SP	Serumprobe
STZ	Streptozotocin
Tab.	Tabelle
TX	Transplantation
U	Units
vs.	versus
w/o	without

**Tabellenverzeichnis**

	Seite
Tab. 1 Applizierte Medikamente und ihre Dosierung	15
Tab. 2 Volumina, Verdünnungen, Messmethoden	18
Tab. 3 Symbolisierung der Irrtumswahrscheinlichkeit bei statistischen Vergleichen	22
Tab. 4 Individuelle und mittlere Transplantatfunktion (MTF) und mittlere Serumglukose (MSG) nach TX von Schweineinseln in diabetische, athymische Ratten in Abhängigkeit vom TX-ort	24
Tab. 5 Einfluss von applizierten iNOS-Inhibitoren auf die individuelle und mittlere Transplantatfunktion (MTF) und mittlere Serumglukose (MSG) und die Wiederfindung von endogenem Insulin nach TX von Schweineinseln in diabetische, athymische Ratten	28
Tab. 6 Individuelle und mittlere Transplantatfunktion (MTF) und mittlere Serumglukose (MSG) nach TX von Schweineinseln in diabetische, athymische Ratten in Abhängigkeit von der NA-Dosis	32

**Abbildungsverzeichnis**

	Seite
Abb. 1 Postprandiale Serumglukose nach TX von Schweineinseln in diabetische, athymische Ratten in Abhängigkeit vom TX-Ort (**= $p<0.01$ , ***= $p<0.001$ )	23
Abb. 2 Serum-Nitrit/Nitrat (%), bezogen auf Ausgangswerte vor TX, 24 h und 48 h nach TX von Schweineinseln in diabetische, athymische Ratten in Abhängigkeit vom TX-Ort (**= $p<0.01$ )	25
Abb. 3 Postprandiale Serumglukose nach Tx von Schweineinseln in diabetische, athymische Ratten in Abhängigkeit von applizierten iNOS-Inhibitoren	26
Abb. 4 Einfluss von applizierten iNOS-Inhibitoren auf die kumulative Transplantatfunktion von Schweineinseln in diabetischen, athymischen Ratten (*= $p<0.05$ , **= $p<0.01$ , ***= $p<0.001$ )	27
Abb. 5 Serum-Nitrit/Nitrat (%), bezogen auf Ausgangswerte vor TX, 24 h und 48 h nach TX von Schweineinseln in diabetische, athymische Ratten in Abhängigkeit von applizierten iNOS-Inhibitoren (*= $p<0.05$ , ***= $p<0.001$ , ns= $p>0.05$ )	29
Abb. 6 Postprandiale Serumglukose nach intraportaler TX von Schweineinseln in diabetische, athymische Ratten in Abhängigkeit von der NA-Dosis (*= $p<0.05$ , ***= $p<0.001$ )	30
Abb. 7 Kumulative Transplantatfunktion von Schweineinseln in diabetischen, athymischen Ratten in Abhängigkeit von der applizierten NA-Dosis (*= $p<0.05$ , ***= $p<0.001$ )	31
Abb. 8 Serum-Nitrit/Nitrat (%), bezogen auf Ausgangswerte vor TX, 24 h und 48 h nach TX von Schweineinseln in diabetische, athymische Ratten in Abhängigkeit von der NA-Dosis (*= $p<0.05$ , **= $p<0.01$ )	32
Abb. 9 Wiederfindung von endogenem Insulin (%) nach TX von Schweineinseln in diabetische, athymische Ratten in Abhängigkeit von der NA-Dosis (**= $p<0.01$ , ***= $p<0.001$ )	33
Abb. 10 Einfluss der Expositionsdauer auf die Expression (%) von HSP-70 in frisch isolierten, hitzeexponierten Schweineinseln (*= $p<0.05$ , ns= $p>0.05$ )	34
Abb. 11 Einfluss der Regenerationsdauer auf die Expression (%) von HSP-70 in frisch isolierten, hitzeexponierten (43°C/90 Min.) Schweineinseln	35

- Abb. 12 Insulingehalt und glukosestimulierte Insulinsekretion ( $\mu\text{U}/\text{IEQ}/90\text{Min.}$ ) von scheinbehandelten und hitzeexponierten Schweineinseln nach 24 h Kultivierung bei  $37^\circ\text{C}$  (\*= $p<0.05$ , ns= $p>0.05$ ) 35
- Abb. 13 Überlebensrate (%) von scheinbehandelten und hitzeexponierten Schweineinseln nach 20 h Inkubation mit NNP oder  $\text{H}_2\text{O}_2$  (\*= $p<0.05$ ) 36
- Abb. 14 Inselviabilität von scheinbehandelten und hitzeexponierten Schweineinseln nach 20 h Inkubation mit NNP oder  $\text{H}_2\text{O}_2$  (\*= $p<0.05$ , ns= $p>0.05$ ) 37
- Abb. 15 Wiederfindung von Schweineinsulin (U/Niere) nach Insel-TX unter die Nierenkapsel von euthymischen, nichtdiabetischen Ratten (\*\*= $p<0.01$ , \*\*\*= $p<0.001$ , ns= $p>0.05$ ) 38
- Abb. 16 Wiederfindung von Schweineinsulin (%) 48 h nach Insel-TX unter die Nierenkapsel euthymischer, nichtdiabetischer Ratten bzw. gleichzeitiger Inselkultivierung bei  $37^\circ\text{C}$  (\*= $p<0.05$ , \*\*= $p<0.01$ , \*\*\*= $p<0.001$ ) 38



## **Danksagung**

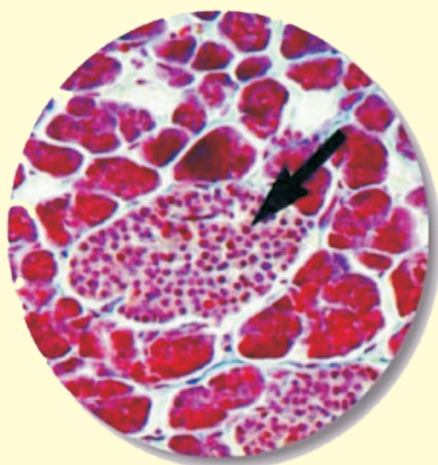
Am Ende meiner Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. med. R. G. Bretzel, Direktor der Medizinischen Klinik III und Poliklinik des Medizinischen Zentrums für innere Medizin der Jutus-Liebig-Universität Giessen, für die Überlassung des Themas und die großzügigen Arbeitsmöglichkeiten im Labor danken.

Frau Prof. Dr. I. Bitsch danke ich recht herzlich für die Übernahme des Koreferates meiner Arbeit.

Frau B. Hußmann, Frau B. Janczik und Frau G. Pfeiffer danke ich für die Überaus freundliche Arbeitsatmosphäre und intensive Zusammenarbeit sowie für die kontinuierliche technische Unterstützung beim Erstellen dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich beim Herrn Dr. H. Jahr für die zahl- und hilfreichen Anregungen bei Versuchsdurchführungen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt jedoch Frau Dr. H. Brandhorst und Herrn Dr. D. Brandhorst für die sehr intensive und kontinuierliche Betreuung und unermüdliche Diskussionsbereitschaft bei der Fertigstellung meiner Arbeit.



édition scientifique  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
GLEIBERGER WEG 4  
D-35435 WETTENBERG

Tel: +49-(0)6406-4413 Fax: -72757  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-89687-089-0



9 783896 870896